

**Dr. Jekyll und Mr. Hyde – Molekulare Antworten von
humanen vaginalen Epithelzellen auf eine Infektion mit
*Candida albicans***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Katja Gremmer
aus Hildesheim

1. Referentin oder Referent:	Professorin Dr. Ursula M. Bilitewski
2. Referentin oder Referent:	Professor Dr. Michael Steinert
eingereicht am:	23.07.2012
mündliche Prüfung (Disputation) am:	19.09.2012

Druckjahr 2012

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Evers, D., Gremmer, K., Sokolis, D. & Bilitewski, U.: The double life of *Candida albicans* (Poster). 3. Gemeinsame Tagung der VAAM und DGHM, Hannover (2010)

Gremmer, K. & Bilitewski, U.: Dr. Jekyll and Mr. Hyde: Molecular Responses of Epithelial Cells During Infection with *Candida albicans* (Poster). 5th European Conference on Prokaryotic and Fungal Genomics, Göttingen (2011)

Gremmer, K. & Bilitewski, U.: Dr. Jekyll and Mr. Hyde: Molecular Responses of Epithelial Cells to an Infection with *Candida albicans* (Poster). 11th ASM Conference on Candida and Candidiasis, San Francisco, CA, USA (2012)

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	VIII
Abstract	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 <i>Candida albicans</i>	1
1.1.1 Asexuelle Vermehrung und Hefe-Hyphe-Dimorphismus	1
1.1.2 Parasexuelle Vermehrung: weiß-opak-Wechsel.....	3
1.1.3 Zellwandaufbau	5
1.2 <i>C. albicans</i> als humanpathogener Pilz	6
1.2.1 Vulvogenitale Kandidose	7
1.2.2 Orale Kandidose	7
1.2.3 Windeldermatitis	8
1.2.4 Systemische Kandidose	9
1.3 Interaktionen mit dem Wirt	9
1.3.1 Adhäsion und Invasion	10
1.4 Abwehrsysteme des Wirtes	11
1.4.1 Reaktionen von Epithelzellen.....	11
1.4.2 Aktivierung von neutrophilen Granulozyten.....	14
1.4.2.1 Primäre neutrophile Granulozyten	15
1.4.2.2 Neutrophil- ähnliche Zelllinie HL-60	17
1.4.3 Andere Immunzellen	18
1.5 Antimikrobielle Peptide	21
1.6 Zielsetzung	22
2 MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 Material	24
2.1.1 Geräte.....	24
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	26
2.1.3 Chemikalien.....	28
2.1.4 Kit-Systeme	29
2.1.5 Antikörper.....	29
2.1.6 Primer	30
2.1.7 Puffer	30
2.1.8 Software.....	31
2.1.9 Verwendete Zellkulturen und Hefen	32

2.2	Methoden	33
2.2.1	Zellzahlbestimmung nach Neubauer	33
2.2.1.1	Bestimmung der Lebendzellzahl	34
2.2.2	Kultivierung von humanen Zellen	34
2.2.2.1	Subkultivierung der A431 Zellen	34
2.2.2.2	Subkultivierung HL-60 Zellen	35
2.2.3	Kryokonservierung humaner Zellen	35
2.2.3.1	Auftauen von kryokonservierten humanen Zellen	35
2.2.4	Differenzieren von HL-60 Zellen	36
2.2.5	Kultivierung von <i>Candida albicans</i>	36
2.2.5.1	Kryokonservierung von <i>Candida albicans</i>	36
2.2.6	Isolierung von polymorphkernigen Granulozyten aus menschlichem Vollblut	37
2.2.7	Infektionsmodelle	38
2.2.7.1	Infektionsmodell ohne direkten Kontakt von Epithel- und Immunzellen	39
2.2.7.2	Infektionsmodell mit direktem Kontakt von Epithel- und Immunzellen im 24-Well Format	40
2.2.7.3	Infektionen mit direktem Kontakt von Epithel- und Immunzellen im 6- Well Format	41
2.2.7.4	Behandlung von Epithelzellen mit Infektionsüberständen	41
2.2.8	LDH-Zytotoxizitätsassay	42
2.2.9	Nachweis von Zytokinen	44
2.2.9.1	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	44
2.2.9.2	FlowCytomix Bead Assay	45
2.2.10	Durchflusszytometrie	46
2.2.11	Genexpressionsanalysen	47
2.2.11.1	Isolierung humaner RNA	48
2.2.11.2	Real Time-PCR	49
2.2.11.3	Ganz Genom Analyse mittels Microarray	51
2.2.12	Fluoreszenz-Färbungen	51
2.2.12.1	Zellkernfärbung mit DAPI	51
2.2.12.2	Lebend/Tot-Färbung	52
2.2.12.3	Intrazelluläre Interleukin 8-Färbung	53
2.2.12.4	<i>Candida albicans</i> Färbung	53
2.2.13	Glukosebestimmung mittels HPLC-Analyse	54
3	ERGEBNISSE	55
3.1	Grundlagen der <i>in vitro</i> Infektionsmodelle	55

3.1.1	LDH Sekretion während der Infektion mit verschiedenen <i>Candida albicans</i> Stämmen.....	55
3.1.2	Einfluss der multiplicity of infection und der Infektionszeit auf die Epithelzellschädigung	58
3.1.3	Differenzieren von HL-60	60
3.2	Infektionsmodell ohne direkten Kontakt von Epithelzellen und Neutrophilen.....	62
3.2.1	Epithelzellschädigung durch <i>C. albicans</i>	63
3.2.2	Zytokin-Nachweis	64
3.3	Infektionsmodell mit direktem Kontakt von Epithelzellen und Neutrophilen	65
3.3.1	Kontinuierliche Aufnahmen der Infektion mit direktem Epithel- und Immunzellen Kontakt.....	65
3.3.2	LDH Messungen in verschiedenen Medien mit und ohne FBS	69
3.3.3	Lebend/Tot-Färbung.....	70
3.3.4	Einfluss von Eisenionen auf die Infektion.....	72
3.3.5	Glukosebestimmung im Infektionsüberstand mittels HPLC	74
3.3.6	Abhängigkeit der IL-8 Sekretion von der <i>C. albicans</i> MOI.....	75
3.3.7	Genexpressionsanalysen mittels Microarrays	77
3.3.8	Abhängigkeit der Zytokin-Sekretion von der Zeit	100
3.3.9	Zytokin Analyse mittels Flow Cytomix Bead Assay	104
3.3.10	Färben von intrazellulärem Interleukin 8	104
3.3.11	Einfluss von LL-37 auf die <i>C. albicans</i> Infektion	106
3.4	Analyse von A431 Oberflächenrezeptoren mittels Durchflusszytometrie.....	108
3.5	Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR.....	112
3.5.1	Vergleich zwischen Microarray und RT-PCR	112
3.5.2	Behandlung von A431 mit Infektionsüberständen	113
4	DISKUSSION	115
4.1	Etablierung der <i>in vitro</i> Infektionsmodelle	115
4.2	Infektionen mit direktem Kontakt zwischen Epithelzellen und Neutrophilen.....	119
4.2.1	Infektionsfilme	119
4.2.2	Epithelzellschädigung während der <i>C. albicans</i> Infektion.....	119
4.2.3	Genexpressionsanalysen.....	121
4.2.4	Einfluss von LL-37	122
4.3	Expression von Oberflächenrezeptoren.....	123
4.4	Real Time PCR.....	124
4.5	Fazit und Ausblick.....	125
5	Literatur	126
Anhang	135

Danksagung.....	141
DVD mit digitalen Anhängen	143

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Wachstumsformen von <i>C. albicans</i>	2
Abb. 1.2: Asexueller Zellzyklus und Wachstum von <i>C. albicans</i> in der Hefe-, Hyphen- und Pseudohyphenform	2
Abb. 1.3: Weißer und opaker Phänotyp von <i>C. albicans</i>	3
Abb. 1.4: Parasexueller Vermehrungszyklus von <i>C. albicans</i>	4
Abb. 1.5: Schematische Aufbau der Zellwand von <i>C. albicans</i>	6
Abb. 1.6: Orale Kandidose mit Ausweitung auf die Speiseröhre eines HIV positiven Patienten mit Zeichen einer fortgeschrittenen Immundefizienz.....	8
Abb. 1.7: Windeldermatitis eines Säuglings	8
Abb. 1.8: Schematische Darstellung von Rezeptoren und deren Signaltransduktionskaskaden.....	12
Abb. 1.9: Signaltransduktionskaskaden in oralen Epithelzellen aufgrund der Besiedlung mit <i>C. albicans</i> Hefen und Hyphen	13
Abb. 1.10: Granulopoese von Neutrophilen und HL-60 Zellen	15
Abb. 1.11: Immunzellen, die eine <i>C. albicans</i> Infektion erkennen können	17
Abb. 1.12: Rekrutierung von Immunzellen durch die von oralen Epithelzellen ausgeschütteten Zytokine und Chemokine während einer <i>C. albicans</i> Infektion ..	19
Abb. 2.1: Schematische Darstellung einer <i>Neubauer improved</i> Zählkammer	33
Abb. 2.2: Fraktionierung der einzelnen Blutbestandteile vor und nach der Dichtegradientenzentrifugation	38
Abb. 2.3: Infektionsmodell ohne direkten Kontakt	39
Abb. 2.4: Reaktionsprinzip des LDH Assays	43
Abb. 2.5: Elektropherogramm der RNA Qualitätskontrolle.....	48
Abb. 2.6: Katalytische Umsetzung von Calcein AM zu Calcein	52
Abb. 3.1: Freigesetzte LDH Konzentrationen während der Infektion mit verschiedenen <i>C. albicans</i> Stämmen.....	56
Abb. 3.2: Hyphenbildung während der Infektion von A431 Epithelzellen mit verschiedenen <i>C. albicans</i> Stämmen	57
Abb. 3.3: LDH Konzentrationen im Infektionsüberstand mit verschiedenen <i>C. albicans</i> Zellzahlen	58
Abb. 3.4: Infektion der Epithelzellen mit verschiedenen <i>C. albicans</i> Zellzahlen	59
Abb. 3.5: Morphologie der Zellkerne während der Granulopoese der HL-60 Zellen.....	60
Abb. 3.6: Stadien der Granulopoese der HL-60 Zellen	61
Abb. 3.7: Interleukin 8 Ausschüttung bei verschiedenen Differenzierungsmitteln	62
Abb. 3.8: LDH Ausschüttung im Infektionsmodell mit Zellkultureinsätzen	63
Abb. 3.9: IL-8 Sekretion im Infektionsmodell mit Zellkultureinsätzen	64
Abb. 3.10: Ausschnitte aus dem Film: „SC5314 infizierte A431 Zellen“	66

Abb. 3.11: Ausschnitte aus dem Film 2.1: „SC5314 infizierte A431 Zellen mit primären humanen Neutrophilen“	67
Abb. 3.12: Ausschnitte aus dem Film 2.2: „SC5314 infizierte A431 Zellen mit primären humanen Neutrophilen_zweiter Film“	68
Abb. 3.13: Phagozytose von <i>Candida albicans</i> durch Neutrophile	69
Abb. 3.14: Lebend/Tot-Färbung nach 7,5 Stunden <i>C. albicans</i> Infektion	71
Abb. 3.15: Lebend/Tot-Färbung nach 18 Stunden <i>C. albicans</i> Infektion	72
Abb. 3.16: LDH Gehalt nach einer <i>C. albicans</i> Infektion bei verschiedenen Fe^{3+} -Ionen Konzentrationen	73
Abb. 3.17: Glukoseverbrauch während einer Infektion der Epithelzellen mit <i>C. albicans</i> und Immunzellen	75
Abb. 3.18: IL-8 Sekretion bei unterschiedlichen <i>Candida albicans</i> Zellzahlen	77
Abb. 3.19: Venn Diagramme der <i>C. albicans</i> infizierten Epithelzellen mit und ohne PMNs nach 7 und 9 Stunden	79
Abb. 3.20: Venn Diagramm der <i>Candida</i> infizierten Epithelzellen mit und ohne PMNs oder HL-60 nach 6,5 Stunden	88
Abb. 3.21: Darstellung der regulierten Gene für Oberflächenrezeptoren	94
Abb. 3.22: Darstellung der regulierten Gene für Zytokine und Chemokine	96
Abb. 3.23: IL-8 Konzentrationen zu verschiedenen Infektionszeitpunkten	101
Abb. 3.24: IL-6 Konzentrationen zu verschiedenen Infektionszeitpunkten	102
Abb. 3.25: TNF- α Konzentrationen zu verschiedenen Infektionszeitpunkten	103
Abb. 3.26: IL-1 α Konzentrationen zu verschiedenen Infektionszeitpunkten	104
Abb. 3.27: Intrazelluläre IL-8-Färbung nach 7,5 Stunden <i>C. albicans</i> Infektion	105
Abb. 3.28: Intrazelluläre IL-8-Färbung nach 18 Stunden <i>C. albicans</i> Infektion	106
Abb. 3.29: LDH Konzentrationen nach einer <i>C. albicans</i> Infektion und LL-37 Behandlung	107
Abb. 3.30: IL-8 Konzentrationen nach einer <i>C. albicans</i> Infektion und LL-37 Behandlung	108
Abb. 3.31: Oberflächenrezeptorexpression nach der <i>C. albicans</i> Infektion mit und ohne Immunzellen	111

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Wichtige Zytokine und Rezeptoren mit Bedeutung für Pilzinfektionen	20
Tab. 2.1: Sensitivitätsbereich der zu analysierenden Zytokine	46
Tab. 3.1: Einfluss von verschiedenen Medien und dem Zusatz von FBS auf die LDH-Messung	70
Tab. 3.2: Fe^{3+} Ionen Konzentration der verwendeten Medien	73

Tab. 3.3: Signifikant regulierte Gene der A431 Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten	78
Tab. 3.5: Gemeinsam induzierte Gene der Proben A431 + <i>Candida albicans</i> 7 h und A431 + <i>Candida albicans</i> + PMN 7 h.....	80
Tab. 3.7: 50 am stärksten induzierte Gene der Probe A431 + <i>Candida albicans</i> + PMN 7 h	83
Tab. 3.11: Gemeinsam induzierte Gene der Proben A431 + <i>Candida albicans</i> 9 h und A431 + <i>Candida albicans</i> + PMN 9 h.....	84
Tab. 3.13: 50 am stärksten induzierte Gene der Probe A431 + <i>Candida albicans</i> + PMN 9 h	85
Tab. 3.15: Regulierte Gene der A431 Zellen nach 6,5 h	87
Tab. 3.18: Gemeinsam induzierte Gene der Proben A431 + <i>Candida albicans</i> und A431 + <i>Candida albicans</i> + PMN	89
Tab. 3.20: 50 am stärksten induzierte Gene der Probe A431 + <i>Candida albicans</i> + PMN	89
Tab. 3.22: 50 am stärksten induzierte Gene der Proben A431 + <i>Candida albicans</i> + PMN und A431 + <i>Candida albicans</i> + HL-60.....	90
Tab. 3.24: 50 am stärksten induzierte Gene der Probe A431 + <i>Candida albicans</i> + HL-60 ...	91
Tab. 3.25: 20 am stärksten reprimierte Gene der Probe A431 + <i>Candida albicans</i> + HL- 60	92
Tab. 3.28: Induzierte Gene der Proben A431 + <i>Candida albicans</i> und A431 + <i>Candida</i> <i>albicans</i> + PMN + A431 und <i>Candida albicans</i> + HL-60	93
Tab. 3.30: Regulierte Gene für Oberflächenrezeptoren	95
Tab. 3.31: Regulierte Gene für Zytokine und Chemokine	97
Tab. 3.32: Regulierte Gene für antimikrobielle Peptide.....	97
Tab. 3.33: Leukozyten und Lymphozyten spezifische Gene.....	99
Tab. 3.34: IL-8 Konzentrationen der Kontrollen.....	101
Tab. 3.35: Proben für die Durchflusszytometrie	109
Tab. 3.36: RT-PCR Analyse der Proben nach 7 h <i>Candida</i> Infektion	113
Tab. 3.37: RT-PCR Analyse von A431 nach Behandlung mit Infektionsüberständen	114
Tab. 3.4: Induzierte Gene der Probe A431 + <i>Candida albicans</i> 7h	135
Tab. 3.6: Gemeinsam reprimierte Gene der Proben A431 + <i>Candida albicans</i> 7h und A431 + <i>Candida albicans</i> + PMN 7h.....	135
Tab. 3.8: 20 am stärksten reprimierte Gene der Probe A431 + <i>Candida albicans</i> + PMN 7h	135
Tab. 3.9: Induzierte Gene der Probe A431 + <i>Candida albicans</i> 9h	136
Tab. 3.10: Reprimierte Gene der Probe A431 + <i>Candida albicans</i> + PMN 9h	136
Tab. 3.12: Gemeinsam reprimierte Gene der Proben A431 + <i>Candida albicans</i> 9h und A431 + <i>Candida albicans</i> + PMN 9h.....	136
Tab. 3.14: 20 am stärksten reprimierte Gene der Probe A431 + <i>Candida albicans</i> + PMN 9h	136

Tab. 3.16: Induzierte Gene der Probe A431 + <i>Candida albicans</i>	137
Tab. 3.17: Reprimierte Gene der Probe A431 + <i>Candida albicans</i>	137
Tab. 3.19: Gemeinsam reprimierte Gene der Proben A431 + <i>Candida albicans</i> und A431 + <i>Candida albicans</i> + PMN	137
Tab. 3.21: 20 am stärksten reprimierte Gene der Probe A431 + <i>Candida albicans</i> + PMN ..	138
Tab. 3.23: 20 am stärksten reprimierte Gene der Proben A431 + <i>Candida albicans</i> + PMN und A431 + <i>Candida albicans</i> + HL-60.....	138
Tab. 3.26: Induzierte Gene der Proben A431 + <i>Candida albicans</i> und A431 + <i>Candida</i> <i>albicans</i> + HL-60	139
Tab. 3.27: Reprimierte Gene der Proben A431 + <i>Candida albicans</i> und A431 + <i>Candida</i> <i>albicans</i> + HL-60	139
Tab. 3.29: Reprimierte Gene der Proben A431 + <i>Candida albicans</i> und A431 + <i>Candida</i> <i>albicans</i> + PMN + A431 und <i>Candida albicans</i> + HL-60.....	139

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
Abb.	Abbildung
AIDS	erworbenes Immundefektsyndrom; engl. <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
Als	engl. <i>agglutin-like sequence</i>
ATCC	American Type Culture Collection
B	B-Zellen
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
Ca	Calcium
Caa	<i>Candida albicans</i>
CCL	engl. (<i>C-C motif</i>) <i>ligand</i>
CD	engl. <i>Cluster of Differentiation</i>

cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cp	Schwellenwert; engl. <i>Crossing point</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DC	Dendritische Zellen; engl. <i>Dendritic cell</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure; engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>
Dnase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
Ec	Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
engl.	englisch
Ep	Epithelzellen
ERK1/2	engl. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	et alii
F	Fibroblasen
FACS	Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie; engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	Fötale Rinderserum; engl. <i>fetal bovine serum</i>
FC	Faktor der Genexpressionsveränderung engl. <i>fold change</i>
Fe	Eisen
g	Gramm
G-CSF	engl. <i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	engl. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
Gra	Granulozyten
h	Stunden engl. <i>hour</i>
HIV	Humanen Immundefizienz-Virus
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie; engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
Hwp	engl. <i>hyphal wall protein</i>
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung

IFN	Interferon
IGB	Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik
IL	Interleukin
JNK	engl. <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KC	Keratinocyten
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
Ma	Makrophagen
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MC	Mastzellen
MCP-1	engl. <i>monocyte chemotactic protein-1</i>
min	Minute
MKP1	MAPK Phosphatase 1
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmillimeter
Mo	Monozyten
MOI	Multiplizität der Infektion; engl. <i>multiplicity of infection</i>
mOsm	milliosmol
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
<i>MTL</i>	engl. <i>Mating Type Like</i>
Na ₂ HPO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	oxidiertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NF-κB	nuklearer Faktor kappa B
NK	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salze; engl. <i>phosphate buffered saline</i>

pCD	plasmacytoide dendritische Zellen
PCR	Polymerasekettenreaktion; engl. <i>polymerase chain reaction</i>
pH	pondus hydrogenii – negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMN	polymorphnukleare Leukozyten
pmol	Picomol
PRR	engl. <i>pattern recognition receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure; engl. ribonucleinacid
rpm	Umdrehungen pro Minute; engl. <i>revolutions per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RPMI ⁺	RPMI mit 10 % hitzeinaktiviertem FBS
RT-PCR	Echtzeit-PCR; engl. <i>real-time PCR</i>
SAP	sekretierte Aspartatprotease
sek	Sekunde
spp.	species pluralis
T	T-Zellen
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
T _H	T-Helferzelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Aktivitätseinheit; engl. <i>unit</i>
UV	Ultraviolett
x g	x fache Erdschwerebeschleunigung: 9,81 m/s ²
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

C. albicans ist ein kommensaler Organismus, der im Gleichgewicht mit der menschlichen Immunabwehr, Haut und Schleimhäute besiedelt. Nur unter bestimmten Bedingungen löst er eine Infektion aus. Die molekularen Mechanismen, die dazu führen, dass der Pilz einen kommensalen Zustand hat und nicht infektiös ist, sind noch weitestgehend unbekannt.

In dieser Arbeit wurde ein *in vitro* Infektionsmodell etabliert, in welchem vaginale Epithelzellen (A431) mit *Candida albicans* (SC5314) infiziert wurden. Als Vertreter des Immunsystems wurden humane Neutrophile (PMN) eingesetzt. Mit Hilfe dieses Modells wurden zeitabhängige Genexpressionsstudien an den Epithelzellen mit Microarraytechnik durchgeführt. Außerdem wurden die Zytokin- und Chemokin-Sekretion und die Rezeptorexpression mittels ELISA und FACS untersucht.

In Abwesenheit der PMNs wurde in den Epithelzellen, während eines 12 stündigen Infektionszeitraums, die Expression nur weniger Gene reguliert. Keiner der Rezeptoren TLR2, TLR4 und Dectin 1, die für die Erkennung von Pilzen bekannt sind, wurde auf den Epithelzellen exprimiert. Von den untersuchten Zytokinen konnte lediglich IL-8 in geringen Konzentrationen detektiert werden. Die Zugabe von PMNs verstärkte die molekularen Antworten der Epithelzellen um ein Vielfaches. In den Epithelzellen wurde die Expression einer Vielzahl von immunmodulatorischen Genen, besonders von Zytokinen und Chemokinen (z.B. IL-8, TNF), pattern recognition receptors (z.B. TLR4, Dectin1) und antimikrobiellen Peptiden (LL-37, Defensine) reguliert.

Dadurch, dass die Epithelzellen normalerweise keine PRRs exprimieren, werden bei einer kommensalen Besiedlung durch *C. albicans* auch keine Entzündungsreaktionen ausgelöst. Ein direkter Kontakt zwischen dem Pilz und PMNs ist nur dann möglich, wenn *C. albicans* die Epithelzellschicht penetriert hat. Dies stellt dann zugleich den Beginn einer Infektion dar. Die PMNs phagozytieren dann nicht nur die Hefe, sondern aktivieren auch die Epithelzellen, so dass diese weitere Immunantworten auslösen können.

Abstract

Candida albicans is one of the most important opportunistic human fungal pathogens. As a commensal organism it colonizes skin and mucosa of the host and turns into a pathogen under predisposing conditions of the host. The relevant signal transduction cascades and regulatory mechanisms allowing the establishment of the commensal state and leading to the successful defense of an infection are still incompletely understood.

We established an *in vitro* infection model, in which colonization of mucosa was represented by the incubation of human vaginal epithelial cells (A431) with *Candida albicans* (SC5314). The additional supply of neutrophils (PMNs) mimicked an active immune system. We performed time-course gene expression analysis of the epithelial cells, cytokine quantification by ELISA and epithelial cell-surface receptor analysis by flow cytometry.

In the absence of PMNs the epithelial cells showed hardly any response to *Candida albicans* during an incubation period of up to 12 hours. This correlated with the observation that neither the toll-like receptors TLR2 or TLR4 nor Dectin1 were expressed to a detectable level. Among the cytokines we determined a low concentration only of interleukin-8. The addition of PMNs led to significant changes of the molecular responses of the epithelial cells. Microarray gene expression analysis showed the upregulation of various immunomodulatory genes. In particular the expression of cytokines (e.g. IL-8, CCL2, TNF), pattern recognition receptors (e.g. TLR4, Dectin-1) and of antimicrobial peptides (LL-37, defensins) was upregulated.

Thus, in the commensal state, epithelial cells hardly express pattern recognition receptors and do not recognize the presence of *C. albicans*. This avoids permanent inflammatory reactions of the host. *C. albicans* is in direct contact with PMNs only after penetration of the epithelial layer, which is the onset of the infection. PMNs eliminate the pathogen by phagocytosis and also activate epithelial cells to induce further immune defense reactions.

1 EINLEITUNG

1.1 *Candida albicans*

Candida albicans ist ein Hefepilz und gehört taxonomisch zur Familie der *Saccharomycetaceae* der Abteilung der Ascomyceten (Schlauchpilze). *C. albicans* ist ein diploider Organismus mit einem Genom von 2 x 16,6 - 16,7 MB für 6419 Gene [Jones *et al.*, 2004]. Die Gattung *Candida* wurde ursprünglich nur für Hefen verwendet, bei denen keine sexuelle Teilung beobachtet werden konnte. Lange Zeit galt *C. albicans* als asexueller Organismus, der ausschließlich in der diploiden Form existiert. Es wurde aber ein „*Mating Type Like*“ (*MTL*) Locus im Genom identifiziert, der homolog zu denen von Pilzen war, die in der Lage sind sich parasexuell zu vermehren. Auch im Labor konnte mittlerweile eine sexuelle Vermehrung von *C. albicans* durchgeführt werden [Bennett & Johnson, 2005; Butler *et al.*, 2009; Kim & Sudbery, 2011]. Charakteristisch für *C. albicans* ist außerdem der Wechsel zwischen unterschiedlichen Morphologien, der als einer der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren betrachtet wird [Calderone & Fonzi, 2001; Whiteway & Oberholzer, 2004].

1.1.1 Asexuelle Vermehrung und Hefe-Hyphe-Dimorphismus

C. albicans ist in der Lage in drei verschiedenen Morphologien zu wachsen - als Hefe, Pseudohyphe und echte Hyphe (Abb. 1.1). Mit diesem sogenannten „phenotypic switch“ ist der Pilz in der Lage auf Veränderungen in der Umgebung zu reagieren. Zellen in der Hefeform teilen sich durch Knospung, wobei die Tochterzelle von der Mutterzelle abgeschnürt wird. Auch die Pseudohyphen bilden Knospen, jedoch werden diese nicht von der Mutterzelle getrennt, sondern bleiben durch ein Septum an der Einschnürung mit ihr verbunden. Dabei können sich durch die Verlängerung der Zelle Filamente aus gestreckten Knospen bilden. Echte Hyphen bestehen aus Ketten von langgezogenen Zellen, die jedoch nicht an Septen eingeschnürt sind (Abb. 1.2) [Soll *et al.*, 1993; Bennett & Johnson, 2003; Sudbery *et al.*, 2004; Kim & Sudbery, 2011].

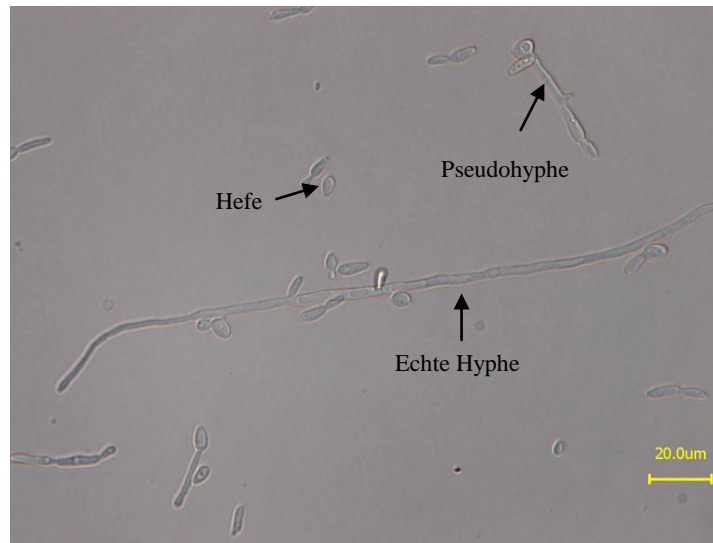


Abb. 1.1: Wachstumsformen von *C. albicans*

Gut zu erkennen sind die einzelligen Hefen, die an den Septen eingeschnürten Pseudohyphen, sowie die in die Länge wachsenden echten Hyphen.

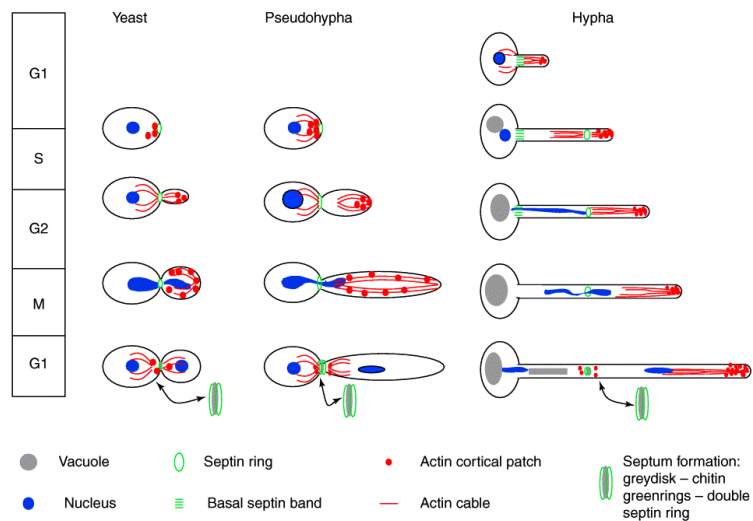


Abb. 1.2: Asexueller Zellzyklus und Wachstum von *C. albicans* in der Hefe-, Hyphen- und Pseudohyphenform

Nach [Sudbery *et al.*, 2004]

Der Wechsel von der Hefe- zur Hyphenform wird durch verschiedene Umgebungsbedingungen induziert. Temperaturen von 37 °C führen zu vermehrter Hyphenbildung, aber auch die Anwesenheit von Serum, ein erhöhter pH-Wert und hohe CO₂ Konzentrationen begünstigen diese Form. Bei 30 °C und saurem pH-Wert wächst der Pilz

bevorzugt in der Hefeform. Pseudohyphen entstehen bei den Bedingungen, die zwischen den oben genannten liegen, also bei Temperaturen von 35 °C und pH-Werten von 5,5.

1.1.2 Parasexuelle Vermehrung: weiß-opak-Wechsel

Von dem *MTL* Locus existieren zwei Formen, welche als *MTL a* und *MTL α* bezeichnet werden. Der *MTL* Locus kontrolliert auch den weiß-opak-Wechsel. Dabei handelt es sich um einen reversiblen Wechsel zwischen dem normalen gleichmäßig rund-ovalen weißem Phänotyp und der doppelt so großen, länglichen, dunkleren Form (Abb. 1.3) [Slutsky *et al.*, 1987; Morschhauser, 2010].

Um sich paaren zu können, muss eine nicht stabile *a/α* heterozygote Zelle zuerst die *MTL*-Homozygose durchlaufen und dabei entweder zu einer homozygoten *a/a* Zelle oder einer homozygoten *α/α* Zelle werden. Anschließend muss eine *a/a* Zelle auf eine *α/α* Zelle treffen, beide Zellen müssen jedoch zuvor in den opaken Phänotyp gewechselt sein (Abb. 1.4). Nur 4 % der klinischen *C. albicans* Isolate sind nicht stabile *a/α* heterozygote Zellen und somit in der Lage diese Homozygose zu durchlaufen, 93 % sind stabile heterozygote *a/α* Stämme, die keine *MTL*-Homozygose durchlaufen können und nur 3 % sind homozygote *a/a* oder *α/α* Zellen.

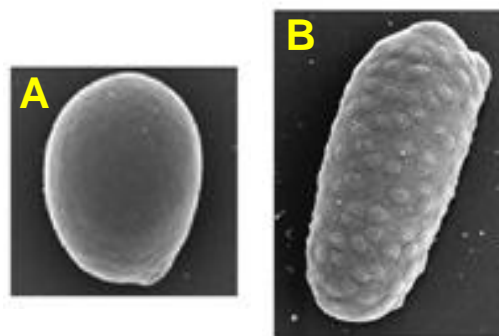


Abb. 1.3: Weißer und opaker Phänotyp von *C. albicans*
Elektronenmikroskopische Aufnahme von *C. albicans* Zellen. A: rund-ovale weiße Zellen; B: doppelt so große, längliche, dunkle opake Zellen. Nach [Soll, 2009]

Zudem wird nur bei etwa 1 von 1000 Zellen der für die parasexuelle Vermehrung wichtige Phänotypwechsel zur opaken Zelle beobachtet. Daher ist eine sexuelle Vermehrung von *C. albicans* sehr selten [Lockhart *et al.*, 2002; Soll, 2009]. Im Labor konnte erst 2009 eine parasexuelle Vermehrung von *C. albicans* durchgeführt werden [Slutsky *et al.*, 1987; Lohse & Johnson, 2009; Soll, 2009].

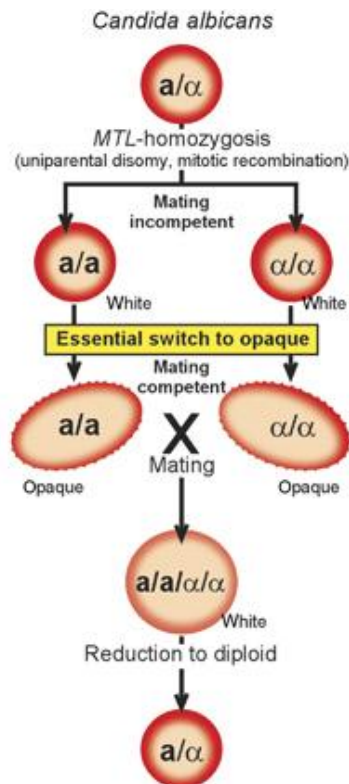


Abb. 1.4: Parasexueller Vermehrungszyklus von *C. albicans*

Aus einer weißen heterozygoten a/α Zelle entstehen zwei homozygote weiße Zellen (eine homozygote a/a und eine α/α Zelle). Diese Zellen müssen nun ihren Phänotyp zur opaken Zelle wechseln. Wenn anschließend eine homozygote opake a/a Zelle auf eine homozygote opake α/α Zelle trifft, können sich diese Zellen parasexuell vermehren. Dadurch entsteht eine neue tetraploide heterozygote weiße $a/a/\alpha/\alpha$ Zelle, welche dann wieder zu einer diploiden heterozygoten a/α Zelle wird.

Nach [Soll, 2009]

Auch bei der Kolonisierung und Infektion des Wirtes spielt der weiß-opak-Wechsel eine Rolle. Weiße Zellen adhären besser als opake an Schleimhäuten, die opaken Zellen hingegen sind besser an ein Wachstum auf der Haut angepasst, da diese Umgebung gute Voraussetzungen für die parasexuelle Vermehrung bietet [Kvaal *et al.*, 1999; Lachke *et al.*, 2003]. Weiße und opake Zellen werden von Neutrophilen gleichermaßen gut phagozytiert. Die weißen Zellen scheinen aber nicht so effizient durch Neutrophile getötet zu werden, wie die opaken Hefen, die auch empfindlicher gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies sind, die von Makrophagen zur mikrobiellen Abwehr gebildet werden. Im Gegensatz zu den weißen Zellen scheiden die opaken keinen Lockstoff für Neutrophile aus. Die opaken Zellen scheinen sich also besser vor dem Immunzellen des Wirtes verstecken zu können, wohingegen die weißen sich besser gegen das Immunsystem zur Wehr setzen können [Kolotila & Diamond, 1990; Geiger *et al.*, 2004].

1.1.3 Zellwandaufbau

Die Zellen von Pilzen sind von einer Zellwand umgeben, die vor allem vor physikalischen Kräften schützt, Form gibt und als Filter wirkt. Die Zellwand ist der Teil von *C. albicans*, der in Kontakt mit der Umgebung steht, unter anderem auch mit den Wirtszellen, auf denen die Hefe siedelt. Da die Struktur der Zellwand typisch für Hefen ist und diese Strukturen nicht in tierischen Zellen vorkommen, sind sie ein geeigneter Angriffspunkt für Antimycotica [Chaffin *et al.*, 1998; Sohn *et al.*, 2006].

Die Zellwand besteht bei *C. albicans* zu ungefähr 80 - 90 % aus Polysacchariden. Diese setzen sich aus drei Hauptgruppen zusammen (Abb. 1.5):

- β -Glukane: Glukosepolymere die β -1,3 oder β -1,6 verknüpft sind
- Chitin: Poly- β -(1,4)-*N*-acetylglukosaminen (GlcNAc)
- Mannane: Mannosepolymere

Des Weiteren enthält die Zellwand zwischen 6 und 25 % Proteine und zwischen 1 und 7 % Lipide [Cassone, 1989; Calderone & Braun, 1991; Chaffin *et al.*, 1998]. Vor allem die Netzwerke aus Chitin und aus den β -1,3-Glukanen bilden das Zellwandskelett und sind für die große physikalische Stabilität verantwortlich. β -1,6-Glukane dienen mehr der Verknüpfung verschiedener Zellwandkomponenten. 47 - 60 % des Gewichts der Zellwand stammt von den β -Glukanen, nur 0,6 - 9 % stammen vom Chitin. Das Chitin ist aber nicht minder wichtig, da die Septen zwischen den sich teilenden Hefen aus Chitin bestehen [Molano *et al.*, 1980]. Die Mannane, welche kovalent an Proteine gebunden sind (Mannoproteine), sind für ungefähr 40 % des Zellwandgewichtes verantwortlich. Die Mannoproteine sind der Hauptbestandteil der Zellwandmatrix.

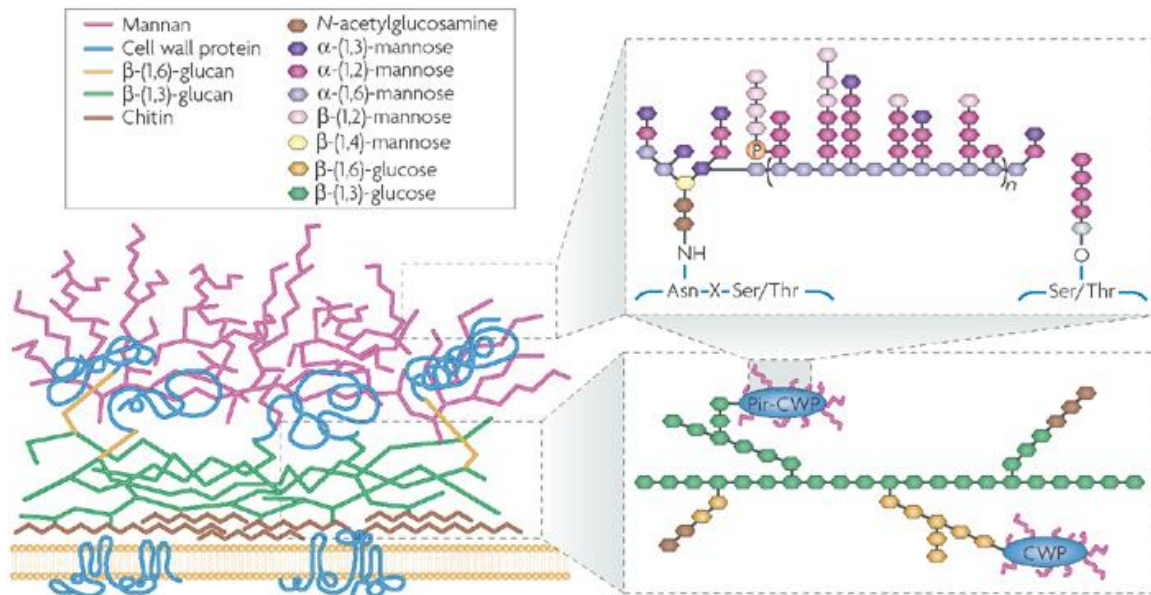


Abb. 1.5: Schematische Aufbau der Zellwand von *C. albicans*

Die Darstellung zeigt die Hauptkomponenten der Zellwand. Der innere Teil der Zellwand, das Zellwandskelett, besteht aus β -(1,3)-Glukanen und Chitin. Die äußere Schicht besteht aus Zellwandproteinen (CWP), die über Glycosylphosphatidylinositolreste an β -(1,6)-Glukane oder bei Mannoproteinen über *internal repeat domains* (Pir-CWP) an β -(1,3)-Glukane gebunden sind.

Nach [Netea *et al.*, 2008]

1.2 *C. albicans* als humanpathogener Pilz

Ein Großteil der gesunden Bevölkerung ist asymptomatisch mit Pilzen der Gattung *Candida* spp. besiedelt. Diese Pilze sind in den Schleimhäuten von Magen, Darm, Speiseröhre, Mund und Vagina zu finden [Kim & Sudbery, 2011; Lim *et al.*, 2012]. Bei etwa 50 % der gesunden mitteleuropäischen Bevölkerung sind *Candida* spp. zudem im Stuhl oder in der Mundhöhle nachweisbar. *Candida albicans* ist dabei die am häufigsten nachgewiesene Art. Andere *Candida*-Spezies von Bedeutung sind: *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* und *C. krusei*. Die kommensale Besiedlung mit den Hefen erfolgt häufig bereits während der Geburt oder im Säuglingsalter [Muller, 1993; Marsh & Martin, 2003]. Auf dem Menschen befindet sich die Hefe dann im Gleichgewicht mit weiteren Organismen der Schleimhautflora und dem menschlichen Immunsystem. Unter besonderen Bedingungen wird aus dem harmlosen kommensalen jedoch ein pathogener Organismus, der sogenannte Kandidosen auslöst. Die genauen Bedingungen, die zu einem Wechsel vom kommensalen zum pathogenen Zustand führen, sind nicht genau bekannt. Es handelt sich bei den Kandidosen

häufig um Sekundärinfektionen, die zu einer bereits bestehenden Erkrankung hinzukommen. Folgende Faktoren begünstigen eine Kandidose:

Physiologische Bedingungen:	Niedriges	oder	hohes	Lebensalter,
	Schwangerschaft, Daumenlutschen			
Erkrankungen:	Infektionen,	AIDS,	Diabetes,	Immundefekte,
	Verbrennungen, Wunden			
Ernährungsweise:	Kohlenhydratreiche Ernährung, Vitaminmangel			
Therapeutische Maßnahmen:	Prothesen,	Katheter,	Antibiotika,	
	Immunsuppressiva, Chemotherapie			

[Calderone, 2002; Kohl & Jodl, 2004; Robert-Koch-Institut, 2004; Tietz *et al.*, 2005; Horn *et al.*, 2012].

1.2.1 Vulvogenitale Kandidose

Eine der am weitesten verbreiteten oberflächlichen Infektion mit *Candida albicans* ist die akute vulvogenitale Kandidose. Etwa 70 - 75 % aller Frauen sind mindestens einmal, 40 - 50 % sogar mehrmals von dieser Infektion betroffen. Seltener, mit nur 5 % aller Frauen, sind hingegen chronische oder wiederkehrende Vulvovaginalmykosen. Diese chronischen oder rezidivierenden Mykosen sind oftmals sehr schwierig zu behandeln, was zu einer starken psychischen Belastung der Betroffenen führt. Die Infektion zeigt sich als weißliche, abstreifbare Beläge an den Schleimhäuten sowie durch Juckreiz, brennen und Ausfluss. Bei Männern kann es zu einer *Candida* bedingten Eichelentzündung, einer sogenannten Candidabalanitis kommen.

Zur Behandlung der vulvogenitalen Kandidose ist oftmals eine lokale Behandlung mit Nystatin als Creme, Paste oder Vaginaltablette ausreichend. Nur bei schwerwiegenden oder therapieresistenten Fällen ist eine systemische Therapie mit fungistatischen Mitteln wie Itraconazol, Fluconazol oder Amphotericin B erforderlich [Kohl & Jodl, 2004; Horn *et al.*, 2012].

1.2.2 Orale Kandidose

Eine weitere häufig auftretende Form der Kandidose ist der Befall der Mundschleimhaut und der Mundwinkel (Mundsoor). Auch bei dieser Form treten weiß-gelbliche leicht abstreifbare Beläge auf der entzündeten Mundschleimhaut, der Zunge und den Tonsillen auf (Abb. 1.6).



Abb. 1.6: Orale Kandidose mit Ausweitung auf die Speiseröhre eines HIV positiven Patienten mit Zeichen einer fortgeschrittenen Immundefizienz
[<http://www.megru.uzh.ch/j3/innere/pat/patpop.php?ID=277>]

Der Befall kann sich bis in die Speiseröhre fortsetzen, was zu schmerzhaften Schluckstörungen und Appetitlosigkeit führen kann. Die orale Kandidose ist eine der häufigsten Erkrankungen von Säuglingen in den ersten Lebensmonaten. Die Säuglinge haben ein noch nicht vollständig entwickeltes Immunsystem und haben somit keine geeigneten Abwehrmechanismen gegen die Hefe.

Bei Erwachsenen gilt der Mundsoor als eine Indikatorerkrankung für HIV Infektionen [Tietz & Mendling, 2001; Marsh & Martin, 2003; Moll, 2010].

1.2.3 Windeldermatitis

Bei Säuglingen tritt häufig auch eine sogenannte Windeldermatitis auf. Dabei nutzt der Pilz das feucht-warme Milieu zwischen den Hautfalten um sich dort zu vermehren und festzusetzen. Es zeigen sich Rötungen mit stark entzündlichen Pusteln, Mazerationen und Erosionen in den betroffenen Bereichen (Abb. 1.7).



Abb. 1.7: Windeldermatitis eines Säuglings
[<http://www.urologiehandbuch.de>]

Bei inkontinenten, adipösen und chronisch bettlägerigen Patienten kann eine intertriginöse Kandidose in den Hautfalten auftreten. Dort zeigen sich dieselben Symptome wie bei der Windeldermatitis [Tietz & Mendling, 2001; Moll, 2010].

1.2.4 Systemische Kandidose

In gesunden Menschen wird eine Invasion von *C. albicans* in den Körper hauptsächlich durch die mechanische Barriere der Haut verhindert. Ist, als Folge einer ernsthaften Erkrankung oder bestimmter Therapien das Immunsystem massiv geschwächt, kann der Pilz in die Blutbahnen gelangen, sich im ganzen Körper ausbreiten und die inneren Organe befallen (systemische Kandidose). In der Regel handelt es sich dabei um nosokomiale Infektionen von Intensivpatienten, die schon vorher von *C. albicans* kolonisiert waren (endogene Infektion). Durch kleine Verletzungen der Mund- oder Darmschleimhaut oder durch kontaminierte Venenkatheter kann die Hefe in den Blutstrom gelangen und die inneren Organe wie Leber, Niere, Milz und das zentrale Nervensystem befallen [Tietz *et al.*, 2005; Kim & Sudbery, 2011]. Auf der Liste der häufigsten Erreger von noskomialen Infektionen auf Intensivstationen befindet sich *Candida albicans* mittlerweile auf dem vierten Platz. Die Mortalität bei einer systemischen Kandidose liegt bei mehr als 60 - 70 %. Das bedeutet, dass bei etwa 4000 systemischen *C. albicans* Infektionen pro Jahr in Deutschland 2500 Menschen an *Candida albicans* sterben [Orfanos & Garbe, 2002; Geffers & Gastmeier, 2011].

1.3 Interaktionen mit dem Wirt

Damit *C. albicans* einen Wirt besiedeln und infizieren kann, muss sie an dessen Zellen adhären können, wobei es zu Wechselwirkungen zwischen der Pilzzellwand und der Oberfläche der Wirtszellen kommt. Dies können sowohl unspezifische Bindungen, wie z.B. hydrophobe Wechselwirkungen, als auch spezifische Protein-Protein-Interaktionen sein.

Ein wichtiger Pathogenitätsfaktor ist der Wechsel vom Hefe- zum Hyphenwachstum, da Hyphen besser auf den Wirtszellen adhären als Hefen und auch nur die Hyphen in der Lage sind in die Epithelzellschichten einzudringen. Es sind jedoch auch auf den Schleimhäuten von asymptomatisch besiedelten Menschen nicht nur Hefen sondern auch Hyphen vorhanden, so dass das Vorhandensein von Hyphen nicht zwangsläufig den Wechsel zum pathogenen Zustand indiziert. [Naglik *et al.*, 1999].

1.3.1 Adhäsion und Invasion

Die Adhäsion an Wirtszellen ist eine notwendige Grundvoraussetzung um einen Wirt zu kolonisieren und infizieren zu können [Chaffin *et al.*, 1998].

Die wichtigsten Proteingruppen zur Adhäsion an Epithelzellen von *C. albicans* sind die Adhäsiine Als1 bis Als5 und Als7 (agglutin-like sequence) sowie Hwp1 (hyphal wall protein), deren Gene *in vivo* bei Patientinnen mit einer vaginalen Candidose gefunden wurden [Monroy-Perez *et al.*; Sandin *et al.*, 1982; Naglik *et al.*, 2011; Wachtler *et al.*, 2011].

Die Invasion von *C. albicans* in Epithelzellen kann durch zwei verschiedene Mechanismen erfolgen: durch induzierte Endozytose oder durch aktive Penetration [Zhu & Filler, 2009; Dalle *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2011]. Die Endozytose ist ein von den Epithelzellen gesteuerter Prozess, der aber durch *C. albicans* induziert wird. Das *C. albicans* Protein Als3, welches hierbei als Invasin wirkt, bindet bei oralen Epithelzellen an E-cadherine und imitiert in der Art der Bindung eine E-cadherin - E-cadherin-Wechselwirkung. Dadurch werden von den Epithelzellen Pseudopodien ausgebildet, die das Pathogen anschließend festhalten und in die Zelle ziehen [Phan *et al.*, 2007]. Da auch tote *C. albicans*-Hyphen endozytiert werden, handelt es sich hierbei zwar um einen durch das auf der Hyphenoberfläche vorhandene Invasin ausgelösten, jedoch von den Epithelzellen gesteuerten Prozess. Die induzierte Endozytose findet hauptsächlich in der frühen Infektionsphase, während der ersten vier Stunden statt [Moreno-Ruiz *et al.*, 2009].

Während der späteren Infektionsphasen (mehr als vier Stunden) findet hauptsächlich die aktive Penetration statt. Bei der aktiven Penetration durchbohren die Hyphen des Pilzes die Epithelzellen oder wachsen zwischen den Epithelzellen durch. Da dieser Prozess auch bei abgetöteten Epithelzellen stattfindet, handelt sich hierbei um einen von *C. albicans* vermittelten Vorgang [Dalle *et al.*, 2009; Wachtler *et al.*, 2011].

Ein weiterer wichtiger Pathogenitätsfaktor sind verfügbare Eisenionen. Eisen ist ein essentielles Spurenelement für alle Organismen, und es herrscht ein ständiger Kampf zwischen den einzelnen Organismen um die begrenzt vorhandenen Eisenionen. Auch eine Kolonisierung des Wirtes ist nur möglich, wenn ausreichend Eisen zur Verfügung steht. Eisen ist jedoch nicht frei auf dem menschlichen Körper vorhanden, 30 % der Eisenionen werden intrazellulär durch das Protein Ferritin gespeichert und 66 % sind an Hämoglobin gebunden. *Candida albicans* ist in der Lage die an Hämoglobin gebundenen Eisenionen für sich zu verwerten. Außerdem wurden Mechanismen beschrieben, nach denen *C. albicans* auch an Ferritin gebundene Eisenionen nutzen kann. Die genauen Mechanismen sind nicht eindeutig

aufgeklärt, aber auch hier scheint das *C. albicans* Protein Als3 eine entscheidende Rolle zu spielen [Almeida *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2009].

1.4 Abwehrsysteme des Wirtes

Die wichtigsten Schutzsysteme des Wirtes vor *C. albicans* Infektionen sind:

- die Epithelzellen der Schleimhäute, welche als eine mechanische Barriere das Eindringen der Hefe in den Körper verhindern,
- das angeborene und das adaptive Immunsystem und
- die körpereigenen löslichen antimikrobiellen Stoffe.

Beim Menschen werden vor allem die Schleimhäute des Gastrointestinaltraktes sowie von Mund und Urogenitalbereich von *Candida albicans* besiedelt, so dass die Epithelzellen dort ständig in Kontakt mit der Hefe stehen. Bislang gibt es nur wenige Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen, die zur Aufrechterhaltung des kommensalen Zustandes führen, beziehungsweise bei einer beginnenden Kandidose ausgelöst werden [Naglik *et al.*, 2011].

1.4.1 Reaktionen von Epithelzellen

Für orale Epithelzellen wurde gezeigt, dass diese mit der Expression der mRNA von den proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen IL-1 α , IL-1 β , IL-8, G-CSF, GM-CSF und TNF- α auf eine Infektion mit *Candida albicans* reagierten [Schaller *et al.*, 2002]. Durch die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine rekrutierten die Epithelzellen Immunzellen, wie Neutrophile, dendritische Zellen und T-Zellen, zum Infektionsort und aktivierten sie dort [Dongari-Bagtzoglou & Kashleva, 2003; Schaller *et al.*, 2004]. Die Anwesenheit der Neutrophile führte dann in den Epithelzellen zu einer weiteren Aktivierung, zum Beispiel der Expression des Gens für den TLR4 Rezeptor [Weindl *et al.*, 2007]. Ohne Neutrophile fand keine Regulation der Expression des Gens für den TLR4 Rezeptor statt. Ein Blockieren des TLR4 Rezeptors durch spezifische Antikörper oder RNAi führte zu einer vermehrten Invasion der Hefe in die Epithelzellen und zu einer erhöhten Zellschädigung. Dies zeigte, dass der TLR4 Rezeptor direkt in das Abwehrsystem des Wirtes integriert sein muss.

Der Rezeptor war jedoch nicht für die erste Erkennung von *C. albicans* und die Aktivierung der Epithelzellen bedeutend. Vielmehr war er wichtig für die anschließenden Schutzmechanismen, die durch die Neutrophile vermittelt wurden. Auch andere PRRs (pattern recognition receptor) wie Dectin 1 werden von oralen Epithelzellen exprimiert. Die

Rezeptoren TLR4 und Dectin 1 scheinen jedoch nicht die einzigen zu sein, die eine Rolle bei der Erkennung von *C. albicans* zu spielen, da trotz einer Blockierung dieser Rezeptoren der MAPK/MKP1/c-Fos Signalweg (Abb. 1.8) in den Epithelzellen aktiviert wurde [Moyes *et al.*, 2010]. Dies lässt darauf schließen, dass auch der TLR2 Rezeptor in die Erkennung von *C. albicans* involviert ist.

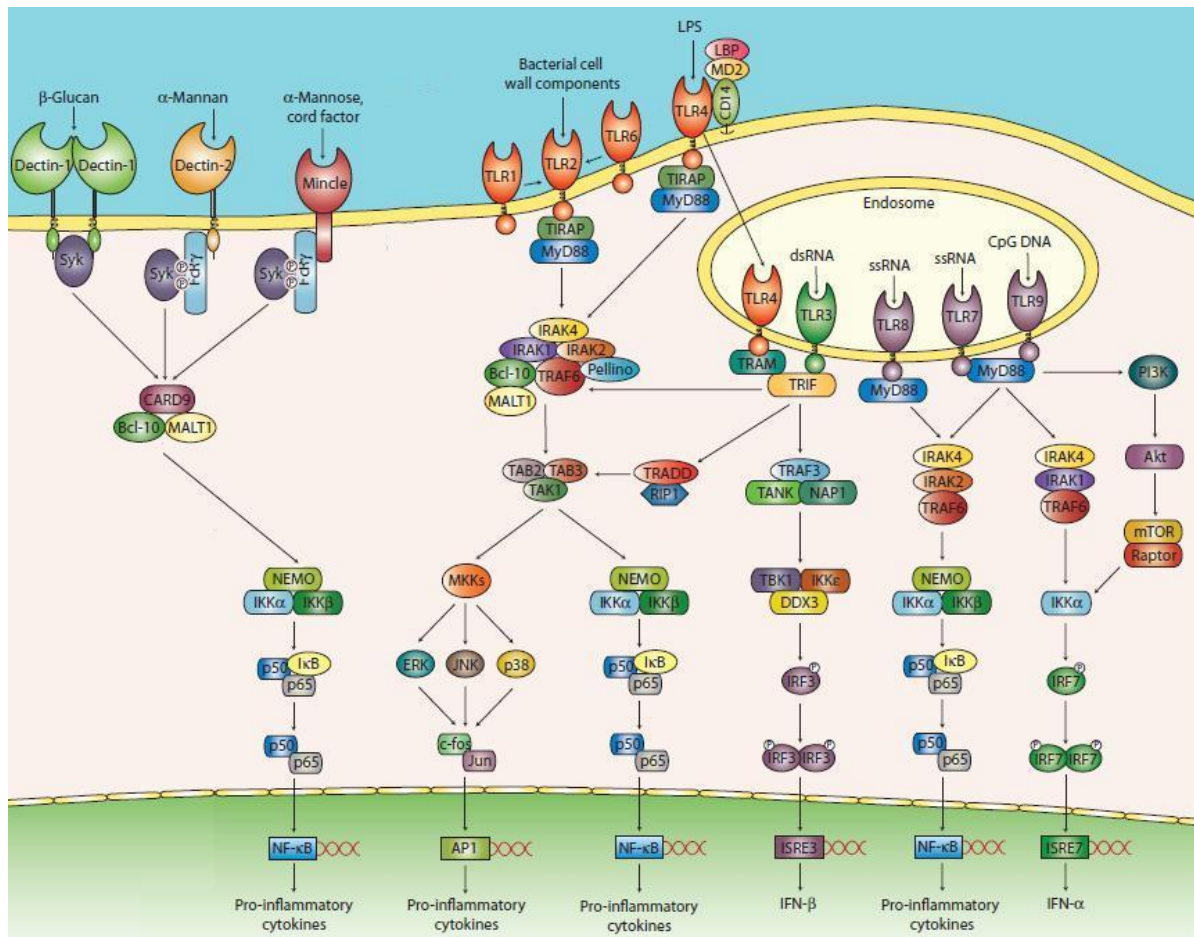


Abb. 1.8: Schematische Darstellung von Rezeptoren und deren Signaltransduktionskaskaden

Die hier dargestellten Rezeptoren und die durch sie aktivierten Signaltransduktionskaskaden sind für die Erkennung von *C. albicans* und die Immunreaktion aufgrund der Infektion von Bedeutung.

Nach [Naglik *et al.*, 2011]

Neuere Untersuchungen von Naglik *et al.* führten zur Modifikation des Modells. Sie ergaben, dass orale Epithelzellen mit unterschiedlichen Signalkaskaden auf die Besiedlung mit *C. albicans* Hefen oder Hyphen reagieren [Naglik *et al.*, 2011]. Nach diesem Modell wird die erste frühe und schwache Antwort auf die Anwesenheit von *C. albicans* durch einen nicht weiter spezifizierten PRR eingeleitet. Durch diesen PRR werden sowohl Hefen als auch Hyphen erkannt und die Signaltransduktionskaskaden des NF-κB Wegs und der drei MAP-

Kinase Wege p38, ERK1/2 und JNK aktiviert. Durch den NF- κ B Signalweg wird der NF- κ B Transkriptionsfaktor und durch den ERK1/2 und JNK Signalweg der Transkriptionsfaktor c-Jun aktiviert und die DNA Transkription begonnen. Welcher Transkriptionsfaktor durch den p38 MAP-Kinase Weg aktiviert wird, wurde nicht weiter untersucht. Bei dieser frühen transienten Antwort werden keine Zytokine oder Chemokine in die Umgebung freigesetzt (Abb. 1.9 A).

Wechselt der Pilz aber in den pathogenen Zustand und bildet Hyphen aus, werden diese Hyphen von den Epithelzellen durch einen weiteren ebenfalls nicht spezifizierten PRR erkannt (Abb. 1.9 B). Dies hat eine zweite, stärkere und dauerhafte Aktivierung des NF- κ B- und der MAP-Kinase Signalwege (vor allem p38 und ERK1/2) zur Folge. Hierbei führt der p38 MAPK-Weg zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktor c-Fos. Dieser führt in Verbindung mit dem Transkriptionsfaktor p65/p50 NF- κ B Heterodimer zur Expression der Gene zur Auslösung der Entzündungsreaktion [Naglik *et al.*, 2011].

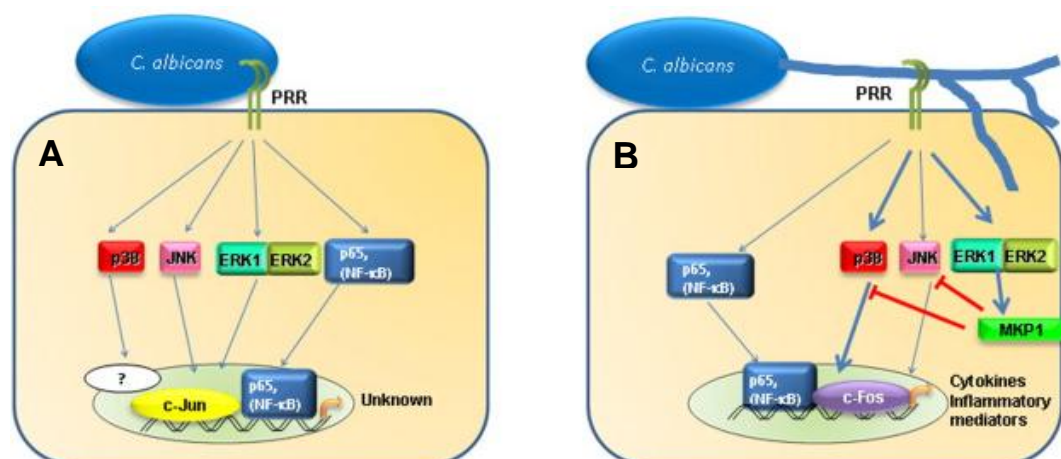


Abb. 1.9: Signaltransduktionskaskaden in oralen Epithelzellen aufgrund der Besiedlung mit *C. albicans* Hefen und Hyphen

A: Frühe transiente Reaktion auf *C. albicans*: Hefen und Hyphen werden unspezifisch durch einen unbekannten pattern recognition receptor (PRR) erkannt und die Signalwege NF- κ B und die MAP Kinase Kaskaden p38, JNK und ERK1/2 aktiviert. Dies führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren c-Jun (durch JNK und ERK1/2) und p65/p50 NF- κ B Heterodimer. Welcher Transkriptionsfaktor durch p38 aktiviert wird ist nicht bekannt. Es werden von der Zelle keine Zytokine oder Chemokine sekretiert; **B:** Späte, verstärkte Reaktion auf *C. albicans*: Mit einem weiteren PRR werden nur die Hyphen erkannt und die MAP-Kinase Signalwege p38 und ERK1/2 werden verstärkt aktiviert. Durch p38 wird der Transkriptionsfaktor c-Fos aktiviert. Die Kombination von p65/p50 NF- κ B Heterodimer und c-Fos steuert die Hochregulation der Gene für die Entzündungsreaktion und für die Zytokinproduktion. Die MAP Kinase Phosphatase MKP1 wirkt negativ regulierend auf p38 und JNK. Dadurch werden eine zu starke Entzündungsreaktion und eine Überreaktion des Immunsystems verhindert. Hierbei werden Zytokine und Chemokine sekretiert. Nach [Naglik *et al.*, 2011]

Da sich eine unkontrollierte übermäßige Entzündungsreaktion negativ auf den Organismus auswirkt, ist bei der Erkennung der Hyphen eine negative Regulation erforderlich. Diese wird durch die Stabilisierung der Phosphatase MKP1 durch den ERK1/2 Signalweg gewährleistet. Die MKP1 deaktiviert die MAP-Kinasen p38 und JNK und verhindert somit eine Überreaktion des Immunsystems. Die MAPK/MKP1/c-Fos Antwort auf die Hyphen war stark von der Menge der Hyphen abhängig. Bei niedrigen Hyphenzahlen blieben die Epithelzellen noch inaktiv. Erst bei Überschreiten einer kritischen Zahl und eines kritischen Ausmaßes der Zellschädigung wurden die Entzündungsreaktionen ausgelöst. Dadurch wird eine Überreaktion des Wirtes auf die kommensale Besiedlung mit *C. albicans* verhindert, ein Wechsel in den pathogenen Zustand wird aber trotzdem erkannt [Moyes *et al.*, 2010; Naglik *et al.*, 2011].

1.4.2 Aktivierung von neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten (polymorphonukleare Leukozyten, PMN) gehören zu den Zellen des angeborenen Immunsystems. Sie haben einen Durchmesser von 10 - 12 µm. Der Kern von unreifen Neutrophilen hat die Form eines geraden oder gebogenen Stabes (stabkerniger Neutrophil). Während der Ausreifung zerfällt der Kern in 3 - 5 Kernsegmente (segmentkerniger Neutrophil) (Abb. 1.10) [Linß & Fanghänel, 1998].

Neutrophile enthalten verschiedene Granula, die für die Abtötung und den Abbau von Pathogenen essentiell sind. Die Primärgranula, zu denen die Azurgranula, azurophilen Granula und unspezifischen Granula gehören, werden im späten Promyelozytenstadium gebildet. In ihnen sind eine Reihe lysosomaler Enzyme, wie saure Phosphatase und Cathepsin G enthalten, aber auch Lysosomen untypische Enzyme wie Myeloperoxidase, alkalische Phosphatase, Kollagenase, Elastase, und basische Proteine. Die Sekundärgranula sind spezifische neutrophile Granula und werden im Metamyelozytenstadium gebildet. Sie enthalten alkalische Phosphatase, Lysozym, Laktoferrin und Cobalophilin [Linß & Fanghänel, 1998].

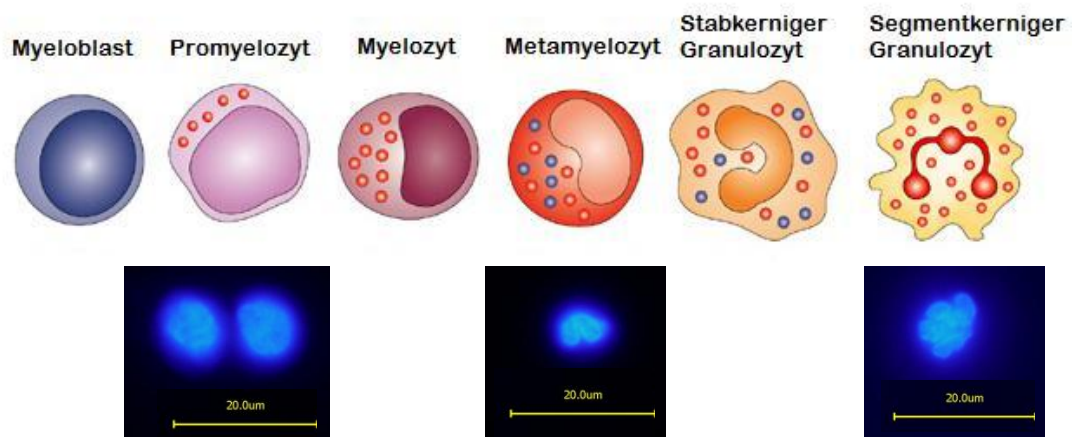


Abb. 1.10: Granulopoese von Neutrophilen und HL-60 Zellen

In der schematischen Darstellung der Zellen ist die Strukturänderung des Zellkerns zu erkennen. Auf den Fotos im unteren Teil ist die Zellkernänderung in HL-60 Zellen während der Differenzierung ersichtlich.

Rote Granula: Primärgranula; Blaue Granula: Sekundärgranula

Nach [Nerlov, 2004]

1.4.2.1 Primäre neutrophile Granulozyten

In gesunden Geweben sind PMNs kaum vorhanden, es sind aber größere Mengen reife Neutrophile im Knochenmark gespeichert. Bei einer Infektion können daher sofort reife Neutrophile in die Blutbahn abgegeben werden, so dass sie innerhalb weniger Stunden zum Ort der Infektion gelangen können. Neutrophile sind zur Chemotaxis befähigt, das heißt sie können einem ansteigenden Gradienten von rekrutierenden Zytokinen und Chemokinen folgen. Mit einer Geschwindigkeit von 20 µm/min zählen sie zu den schnellsten mobilen Säugerzellen [Linß & Fanghänel, 1998; Niggli, 2003; Schütt & Bröker, 2009].

Haben die Neutrophilen den Infektionsherd erreicht, erkennen sie das Pathogen über verschiedene PRRs. Neutrophile können Pathogene durch verschiedene Mechanismen unschädlich machen:

- **Phagozytose:** die Phagozytose ist die Rezeptor vermittelte Aufnahme von Fremdorganismen oder Partikeln. Dabei stülpt sich die Plasmamembran des Phagozyten um das Pathogen und zieht es in sich hinein. In der Zelle werden eine Reihe von abbauender Reaktionen induziert, die das Pathogen in dem Phagozyten töten und abbauen [Nordenfelt & Tapper; Lee *et al.*, 2003]. Ist der Fremdkörper zu groß um von den Neutrophilen aufgenommen zu werden, werden antibakterielle Enzyme von den Primär- und Sekundärgranula (Lysozym, Laktoferrin, Cathepsin, Elastase, Kollagenase) ausgeschieden und das Pathogen außerhalb der Zelle abgebaut.

Die Bruchstücke werden anschließend von den Neutrophilen endozytiert und vollständig abgebaut (frustrierte Phagozytose) [Linß & Fanghänel, 1998].

- „Oxidative burst“: Unter dem „oxidative burst“ versteht man die Freisetzung von Sauerstoffradikalen im Phagosom. Der oxidative burst wird nach der Phagozytose eines Pathogens aktiviert. Die toxische Wirkung der Sauerstoffradikale basiert auf der Oxidation von ungesättigten Fettsäuren von Membranlipiden, der Vernetzung von Membranproteinen und der Inaktivierung von Enzymen. Da die Sauerstoffradikale membranpermeabel sind, wird nicht nur das Pathogen, sondern auch umliegendes humanes Gewebe zerstört. Deshalb ist eine genaue Regulation zwischen Abtötung und Eigenschädigung wichtig [Hampton *et al.*, 1998; Linß & Fanghänel, 1998].
- Neutrophil Extracellular Traps (NETs): Die NETs sind eine spezielle Form des Zelltods der Neutrophilen, dabei werden Netze aus Chromatinfasern in Richtung Pathogen ausgestoßen. Diese sind mit Serinproteasen, antimikrobiellen Proteinen wie Calprotectin und anderen Molekülen wie Histonen überzogen. Mikroorganismen bleiben in den NETs „kleben“ und werden abgetötet [Ermert *et al.*, 2009; Urban *et al.*, 2009].

Neutrophile, die mit *Candida albicans* inkubiert wurden, zeigten eine Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine und Chemokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 und IFN- γ [Vecchiarelli *et al.*, 2000; Romani, 2004; Netea *et al.*, 2006]. Chemokine, wie IL-8, sind kleine Zytokine, deren „Hauptaufgabe“ in der Auslösung der Chemotaxis von Neutrophilen liegt [Fernandez & Lolis, 2002]. Gleichzeitig wurden auch die antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 freigesetzt. Durch dieses Zusammenspiel zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen ist der Wirt in der Lage, eine Infektion mit *C. albicans* zu bekämpfen, verhindert jedoch, durch die gleichzeitige Ausschüttung der antiinflammatorischen Zytokine, eine Überreaktion des Immunsystems [Tonnetti *et al.*, 1995; Kaposzta *et al.*, 1998; Netea *et al.*, 1999; Romani, 2004; Netea *et al.*, 2006].

Auf Makrophagen und Neutrophilen von Mäusen wurden zahlreiche verschiedene PRRs identifiziert, die für die Erkennung von *C. albicans* wichtig sind (Abb. 1.11). Dazu gehörten die Toll-like Rezeptoren 2 und 4 (TLR2 und TLR4), der Dectin 1- und der Mannose Rezeptor. Ein Komplex aus Dectin 1 mit TLR2 erkennt die β -(1,3)-Glukane von *C. albicans*. Eine Aktivierung des Dectin 1/TLR2 Rezeptor-Komplexes führte zur Produktion von IL-10, IL-6 und IL-17 [Netea *et al.*, 2006; Netea *et al.*, 2008]. TLR2 alleine erkennt die

Phospholipomannane und Zymosan, Dectin 1 Zymosan und TLR4 erkennt die Mannosylreste der *C. albicans* Zellwand [Gross *et al.*, 2006; Netea *et al.*, 2006; Netea *et al.*, 2008].

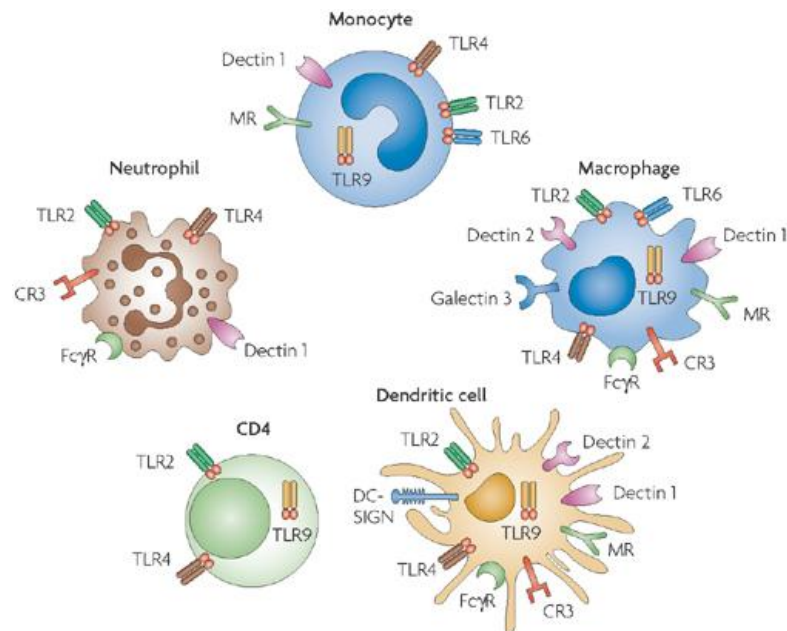


Abb. 1.11: Immunzellen, die eine *C. albicans* Infektion erkennen können

Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems, die eine *C. albicans* Infektion erkennen können, gehören die Monozyten, Makrophagen und Neutrophile. Zur adaptiven Immunantwort gehören die dendritischen Zellen und die CD4⁺ T-Zellen. Die dendritischen Zellen prozessieren und präsentieren das Antigen den CD4⁺ T-Zellen und aktivieren dadurch eine spezifische Immunantwort. Auf den Zellen sind die jeweiligen pattern recognition receptors (PRR) dargestellt: CR3: complement Rezeptor 3; FcγR: Fcγ Rezeptor; MR: Mannose Rezeptor; TLR: Toll-like Rezeptor

Nach [Netea *et al.*, 2008]

In einem *in vitro* Infektionsmodell wurde gezeigt, dass Neutrophile zum Schutz der Epithelzellen vor Zerstörung durch *C. albicans* beitragen können, ohne mit ihnen oder *C. albicans* in direktem Kontakt stehen zu müssen. Die mit *C. albicans* infizierten Epithelzellen wurden durch eine poröse Membran von den Neutrophilen getrennt, so dass keine Migration der Immunzellen in die Epithelzellschicht und auch keine Phagozytose des Pilzes möglich war. Trotzdem konnte eine deutliche geringere Zellschädigung der Epithelzellen beobachtet werden [Schaller & Weindl, 2009; Weindl *et al.*, 2010].

1.4.2.2 Neutrophil- ähnliche Zelllinie HL-60

Bei den HL-60 Zellen handelt es sich um promyeloische Zellen einer 36-jährigen Patientin mit einer akuten promyeloischen Leukämie [Gallagher *et al.*, 1979]. Diese Zellen lassen sich durch die Zugabe von DMSO oder Retinsäure zu Neutrophil-ähnlichen Zellen differenzieren

[Collins *et al.*, 1978]. Während der Differenzierung durchlaufen die HL-60 Zellen die natürliche Granulopoese, die auch Neutrophile während ihrer Reifung im Knochenmark durchlaufen (Abb. 1.10).

Die differenzierten HL-60 Zellen zeigen ähnliche Eigenschaften wie primäre Neutrophile. Sie haben die gleiche Morphologie und besitzen die Fähigkeit zur Phagozytose, Chemotaxis und dem oxidativen Burst [Collins *et al.*, 1978; Breitman *et al.*, 1980]. Außerdem sekretierten differenzierte HL-60 Zellen IL-1 β und IL-8 wenn sie mit vitaler *C. albicans* infiziert wurden, und IL-6, IL-8, IL-12 und TNF- α , wenn sie mit Hitze getöteten *C. albicans* behandelt wurden. Auch die Regulation der Gene für die Rezeptoren TLR2, TLR4 und Dectin 1 konnte bei einer Infektion der differenzierten HL-60 Zellen mit *C. albicans* beobachtet werden [Saegusa *et al.*, 2009].

1.4.3 Andere Immunzellen

Neben den Neutrophilen werden auch andere Zellen des Immunsystems von den Epithelzellen zum Infektionsort rekrutiert.

Dendritische Zellen werden durch das, von den Epithelzellen sekretierte Chemokin CCL20 und das antimikrobielle Peptid β -Defensin 2 angelockt (Abb. 1.12). Dendritische Zellen besitzen PRRs wie TLR2, TLR4, Mannose-Rezeptor, Dectin 1 und Dectin 2 (Abb. 1.9). Nachdem sie ein Antigen von *C. albicans* über den DC-Sign Rezeptor aufgenommen haben, wandern die Zellen zu den Lymphknoten und präsentieren dort das Antigen den CD4⁺ T-Zellen, was eine Aktivierung von T_H17 Zellen zur Folge hat [Cambi *et al.*, 2003; Male, 2005; Schütt & Bröker, 2009]. Studien an Mäusen und immunsupprimierten AIDS- und Organtransplantationspatienten deuten darauf hin, dass T_H1 CD4⁺ Zellen den Wirt vor einer oralen oder gastrointestinalen Infektion schützen, da das Fehlen dieser Zellen Patienten anfälliger für diese Kandidosen machte [Naglik *et al.*, 2008]. Vor einer vaginalen Kandidose scheinen diese Zellen aber nicht zu schützen. Vaginale *C. albicans* Infektionen können trotz einer funktionalen T_H1 Zell-Immunabwehr auftreten. Bei dieser Infektion ist offensichtlich ein Versagen anderer Abwehrmechanismen der vaginalen Schleimhaut, wie saurer pH, vorhandene Milchsäurebakterien, zusammen mit $\gamma\delta$ T-Zellen und dendritischen Zellen, von größerer Bedeutung [Fidel, 2007].

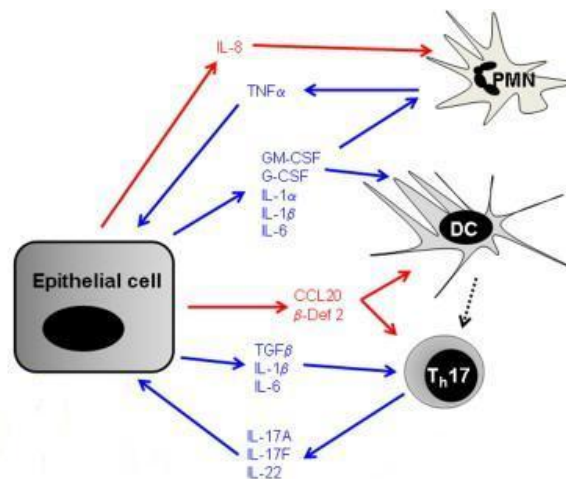


Abb. 1.12: Rekrutierung von Immunzellen durch die von oralen Epithelzellen ausgeschütteten Zytokine und Chemokine während einer *C. albicans* Infektion

Durch die Infektion mit *C. albicans* werden verschiedene Zytokine (blau) und Chemokine (rot) von den Epithelzellen sekretiert. Dadurch werden verschiedene Immunzellen aktiviert und zum Ort der Infektion gelockt.

Nach [Naglik *et al.*, 2011]

Durch die von den Epithelzellen sekretierten Zytokine TGF- β , IL-1 β und IL-6 werden auch T_H17 Zellen zum Entzündungsherd „gelockt“. T_H17 Zellen werden außerdem durch IL-23 stimuliert, das von dendritischen Zellen sekretiert wird [De Luca *et al.*, 2010]. Es wurde gezeigt, dass T_H17 Zellen bei einer oralen *C. albicans* Infektion die Zytokine IL-17A, IL-17F und IL-22 ausschütten [Conti *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2009]. *In vivo* Studien an Mäusen ergaben, dass die Zytokine IL-17 und IL-22 zusammen auf Epithelzellen wirken und diese zur Produktion von antimikrobiellen Peptiden anregen. Dabei werden unter anderem die antibakteriellen Reg-Proteine und die gegen *C. albicans* wirkenden S100 Proteine S100A8 und S100A9 sekretiert [Liang *et al.*, 2006; De Luca *et al.*, 2010].

In Tab. 1.1 sind die in dieser Arbeit näher behandelten Zytokine und Rezeptoren noch einmal zusammengefasst.

Tab. 1.1: Wichtige Zytokine und Rezeptoren mit Bedeutung für Pilzinfektionen

B: B-Zellen; DC: dendritische Zellen; Ec: Endothelzellen; Ep: Epithelzellen; F: Fibroblasten; Gra: Granulocyten; Kc: Keratinocyten; MC: Mastzellen; Ma: Makrophagen; Mo: Monocyten; NK: natürliche Killerzellen; pDC: plasmacytoide dendritische Zellen; PMN: neutrophile Granulozyten; T: T-Zellen; T_H: T-Helferzellen

Quellen: ¹[Murphy *et al.*, 2009]; ²[Rink *et al.*, 2012]; ³[UniProtKB/Swiss-Prot]; ⁴[Gross *et al.*, 2006]

Zytokin	Exprimierende Zellen	Wirkung
CCL2	Mo, Ma, F, Kc ¹	Aktiviert Makrophagen, Stimuliert T _H 2-Immunität ¹
IL-1	pDC, Mo, Ma ² Kc ¹	Fördert Entzündungen in der Akutphase, stimuliert TH und B ² , verstärkt Immunantwort ¹
IL-6	Mo, F, Ec, T, B, Ma, Gra ² , DC ¹	Entzündung, B-Differenzierung ² , verstärkt Immunantwort ¹
CXCL8 (IL-8)	Mo, Ma, F, Ec ² , DC, Kc ¹	Chemotaxis ² , Chemoattraktor für neutrophile Zellen, Angiogenese ¹
TNF- α	Ma, Mo, T, NK ² , DC ¹	Inflammatorisch, Akutphase ² , induziert Veränderungen im Gefäßendothel ¹
G-CSF	Mo, Ma, PMN ²	Hämatopoese von Gra ²
GM-CSF	T, Ma ²	Wachstum von Gra- und Mo-Vorläuferzellen ²
IFN- γ	T _H 1, NK ²	Fördert TH1 und zelluläre Immunität, aktiviert Ma ²
IL-4	T _H 2 ²	Fördert TH2 und humorale Immunität ²
IL-10	T, Mo, MC ²	Antiinflammatorisch, hemmt die T _H 1-Antwort ²
IL-17A und F	T _H 17 ²	Inflammatorisch, Mobilisierung von PMN ²
IL-22	T ²	Inflammatorisch ²
Rezeptor	Liganden	Erkannte Pathogene
CLEC4E	α -Mannose, Trehalose6,6'-dimycolate, SAP130 ³	Beschädigte Zellen, Pilze (<i>C. albicans</i>), Mycobakterien ³
CLEC7A (Dectin-1)	β -1,3- und β -1,6-Glukane ³ , Zymosan ⁴	Bakterien und Pilze (<i>C. albicans</i>) ³
CXCR1 (IL8RA)	CXCL6, -7, -8 (IL-8) ²	
CXCR4	CXCL12 ²	HIV
TLR2	Peptidoglykane, Lipopeptide, Zymosan ²	Grampositive und -negative Bakterien, Mycoplasmen, Hefen, Pilze, Parasiten, Viren ²
TLR4	Lipopolysaccharid ² , Lipoteichonsäuren ¹	Gramnegative Bakterien ² , Grampositive Bakterien ¹
TLR8	Einzelsträngige RNA2	Viren ²
Mannose-Rezeptor	Mannose	Pilze
DC-Sign	Mannose	Bakterien, Pilze, Viren

1.5 Antimikrobielle Peptide

Das Peptid LL-37 ist das aktive C- terminale Fragment des kationischen antimikrobiellen Proteins hCAP18, dem einzigen Vertreter der Cathelicidine in menschlichen Zellen, welches durch das *CAMP*-Gen codiert wird. Es ist in den Granula von Neutrophilen gelagert, wird aber auch von verschiedenen Epithelzellen während einer Infektion oder Entzündung sekretiert. LL-37 hat nicht nur antimikrobielle Eigenschaften, sondern aktiviert auch das Immunsystem (Monozyten, dendritische Zellen). Im kommensalen Zustand ist LL-37 mit einer Konzentration von 5 - 10 µg/ml im Blut vorhanden. Bei einer akuten inflammatorischen Reaktion steigt dieser Wert auf 25 - 50 µg/ml. Seine antimikrobielle Wirkung beruht auf dem Einbau in die Zellmembran und die Zellwand von grampositiven Bakterien, was zu einem Verlust von Ionen und kleinen Molekülen in der Zelle führt. [Scott *et al.*, 2002; Bowdish *et al.*, 2004; Bowdish *et al.*, 2005]. Die Behandlung von *C. albicans* mit LL-37 führte zu einer reduzierten Adhäsion des Pilzes an Plastikoberflächen, orale epidermoide OECM-1 Zellen und Harnblasen von weiblichen BALB/c Mäusen. Dies wurde auf eine Bindung an Mannane und an Chitin und Glukane der *C. albicans* Zellwand zurückgeführt [Tsai *et al.*, 2011].

Auch die Defensine gehören zur Klasse der antimikrobiellen Peptide. Defensine kommen in großen Mengen in den Granula von Neutrophilen vor, können aber auch von Epithelzellen sekretiert werden. Sie wirken antimikrobiell gegen eine Vielzahl von Bakterien, Pilzen und Viren, können aber auch die Immunantwort des Wirtes stimulieren.

Defensin alpha 3 (DEFA3) ist vor allem in den Granula von Neutrophilen gespeichert, wird aber auch von dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen, $\gamma\delta$ T-Zellen und Monozyten sekretiert [Escribese *et al.*, 2011].

Über Defensin alpha 4 (DEFA4) ist nicht viel bekannt. Es wird ebenfalls von Neutrophilen gebildet und scheint eine stimulierende Wirkung auf die Corticosteroidsynthese zu haben [www.ncbi.nlm.nih.gov].

Granulysin (GNLY) wird von natürlichen Killerzellen und zytotoxischen T-Zellen gebildet. Es hat eine antimikrobielle Wirkung auf Bakterien, Pilze und Parasiten und eine zytolytische Wirkung auf Tumorzellen. Des Weiteren wirkt es als Chemoattractant und regt Monozyten zur Produktion von Zytokinen und Chemokinen an [Deng *et al.*, 2005].

1.6 Zielsetzung

Verschiedene Faktoren, wie steigende Lebenserwartungen und verbesserte Therapien schwerer Erkrankungen begünstigen das Ausbrechen von Pilzinfektionen, so dass die Zahl der Risikopatienten vor allem auf Intensivstationen von Krankenhäusern steigt. Da Pilzinfektionen zu Komplikationen bei der eigentlichen Therapie führen und die Diagnostik immer noch zeitaufwendig ist, werden Antimykotika häufig prophylaktisch gegeben.

Gängige Antimykotika sind jedoch nicht frei von Nebenwirkungen und nicht gegen alle *Candida* Arten gleich wirksam. Aus diesem Grund gibt es ein großes Interesse an neuen therapeutischen Strategien und werden umfangreiche Untersuchungen zu den zur Pathogenität von *C. albicans* führenden Mechanismen durchgeführt. Allerdings liegt das Hauptaugenmerk auf den Regulationsmechanismen in dem Hefepilz, mit dem er auf die Anwesenheit von Epithelzellen reagiert. Ein anderer Forschungsschwerpunkt sind die Reaktionen von Phagozyten auf die Pathogene. Demgegenüber wurden die Wechselwirkungen zwischen Epithelzellen und *C. albicans* und die Rolle des Immunsystems noch wenig auf molekularer Ebene untersucht. Da ein detailliertes Verständnis des kommensalen und des beginnenden pathogenen Zustandes zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien beitragen kann, sollte in dieser Arbeit zunächst ein Zellkultursystem etabliert werden, das sowohl Epithelzellen, als auch Zellen des Immunsystems und das Pathogen *C. albicans* umfasste. Dabei repräsentiert das System aus Epithelzellen und *C. albicans* die kommensale Kolonisation von Schleimhäuten, und die gleichzeitige Anwesenheit von Immunzellen simuliert die beginnende Entzündung als Teil der Infektionsabwehrreaktionen. In diesem System sollten dann vor allem die Reaktionen der Epithelzellen auf die verschiedenen infektionsrelevanten Zustände auf einer molekularen Skala analysiert werden.

Um möglichst reproduzierbare Daten zu gewinnen, sollten keine primären Epithelzellen, sondern die humane Epithelzelllinie A431 verwendet werden. Als Vertreter des Immunsystems sollten humane Neutrophile eingesetzt werden. Primäre Neutrophile müssen für jeden Versuch aus menschlichem Blut frisch isoliert werden. Da eine Blutabnahme immer ein potentielles Risiko für den Spender darstellt und das Verhalten der Neutrophile nicht nur von Spender zu Spender, sondern auch von der jeweiligen Verfassung des einzelnen Spenders abhängt, sollte als Alternative die Neutrophil ähnliche permanente Zelllinie HL-60 verwendet werden. Es sollten außerdem zwei verschiedene Infektionsmodelle etabliert werden. Zum einen sollten die infizierten Epithelzellen keinen direkten Zellkontakt zu den Neutrophilen

haben. Damit sollten die molekularen Antworten der Epithelzellen untersucht werden, die durch die von den Neutrophilen sekretierten Substanzen ausgelöst werden. Zum anderen hatten die infizierten Epithelzellen, und damit auch das Pathogen *C. albicans* direkten Kontakt zu den Neutrophilen.

Die Analyse dieser Modellsysteme sollte die Schädigung der Epithelzellen, die Expression von Genen und die Bildung der entsprechenden Proteine umfassen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

In den folgenden Abschnitten sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien aufgeführt.

2.1.1 Geräte

Bezeichnung	Typ, Hersteller
Analysewaagen	Research, Sartorius
Brutschränke	CO ₂ -Auto-Zero, Heraeus HeraCell 150i, Thermo Scientific
Brucheisautomat	Ziegra
Bunsenbrenner	Fireboy, Heraeus
Dampfsterilisatoren	Belimed Infection Control Sauter 464 Zirbus HST 4-5-6
Durchflusszytometer	FACS Canto, BD Bioscience
HPLC	LC 1200 System mit Dioden Array Detektor, Agilent Technologies
HPLC-Säule	Rezex RoA-Organic Acid H ⁺ (8 %) Säule, Phenomenex SecurityGuard-Vorsäule, Phenomenex
Kapillarelektrophorese (RNA)	2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies
Kulturschüttler	Pilot-Shake, Kühner Multitron, Infors-HAT
Magnetrührer	MR 2002, Heidolph
Mikroskope	Biozero BZ-8100, Keyence CKX41/U-RFLT50, Olympus Axioplan, Zeiss

Mikroskopkamera	ColorView SIS FireWire Camera 3.0
Mikrotiterplattenabsorptionsleser	µQuant, BioTek
Mikrotiterplattenschüttler	Titramax 1000, Heidolph Comfort 5355R, Eppendorf
Mikrotiterplattenwäscher	Elx50, BioTek
Multikanalpipetten	Transferpette [®] -12 electronic: 0,5 - 10 µl; 5 - 100 µl, Brand Transferpette [®] -8 electronic: 1 - 20 µl; 5 - 100 µl, Brand Transferpette [®] S -8 10-100 µl Research Mehrkanal 10-100 µl, Eppendorf
Pipetten	Research 0,5 - 10 µl, Eppendorf Research 2- 20 µl, Eppendorf Research 20- 200 µl, Eppendorf Research 100- 1000 µl, Eppendorf
Pipettierhilfen	Easypet [®] , Eppendorf CellMate Matrix, Thermo Scientific
real-time PCR System	Light Cycler [®] 480, Roche
Rotoren	Ausschwingrotor A-4-44, Eppendorf Festwinkelrotor F-34-6-38, Eppendorf F45-30-11 Eppendorf Ausschwingrotor JS-5.3, BeckmanCoulter
Spektrolphotometer	NanoDrop1000, Peqlab
Sterilwerkbänke	HeraSafe KS 12, Thermo Scientific MaxiSafe 2020, Thermo Scientific HLB 2448, Heraeus
Thermocycler	Personal Cycler, Biometra
Thermomixer	5437 Eppendorf
Vakuumpumpe	XF54 230 50, Millipore
Vortexer	Vortex Genie 2, Scientific Industries

Waagen	PC4400, Mettler Sartorius excellence
Wasseraufreinigung	Reinstwassersystem Milli-Q Academic A10, Millipore
Wasserbäder	Schüttelwasserbad 3047, Köttermann
Zählkammer	Neubauer improved, Assistent Germany
Zentrifugen	Biofuge fresco, Heraeus 5804R, Eppendorf 5402 Eppendorf 5415 Eppendorf Spout [®] Mini-zentrifuge, Kleinfeld Labortechnik Avanti [®] J-E. Beckman Coulter

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ, Hersteller
4-Kompartiment-Schalen	Cellview glas bottom dish 627870, Greiner Bio-One
Abdeckfolien	für ELISA-Platten 900110, HJ-Bioanalytik
Abdeckmatten	für HPLC 96-Well-Platten 5042-1389, Agilent
Blutabnahmeröhrchen	7,5 ml S-Monovettenröhrchen, Sarstedt 01.1605.001
Combitips	10 ml 1 = 0,2 ml , 12,5 ml 1 = 250 µl, Eppendorf
Deckgläschen	20 x 26 mm für Neubauer improved Zählkammer, Menzel 18 x 18 mm, Menzel
Einwegpipetten	Costar Stripette 5 ml 4487, 10 ml 4488, 25 ml 4489, Corning
Filterspitzen	TipOne [®] S1121-3810 10 µl, Starlab TipOne [®] S1120-1810 20 µl, Starlab TipOne [®] S1126-7810 1000 µl, Starlab
Kryoröhrchen	Nalgene [®] Cyroware™ 5000-0020, Nalgene Nunc Int.
Multiwellplatten	6-Well-Platten 657160, Greiner Bio-One

	24-Well-Platten 662160, Greiner Bio-One
	96-Well-Platten für ELISA high-bindig 675061, Greiner Bio-One
	96-Well-Platten 353916, BD Falcon
	96-Well-Platten volumenreduziert 3697, Corning
	96-Well-Platten für HPLC 5042-1385, Agilent
	384-Well-Platten, Corning
Objektträger	76 x 26 mm, Menzel
PCR Gefäße	8er Streifen mit Deckel 781320 und 781340, Brand
Pasteurpipetten	aus Glas 747720, Brand
Pipettenspitzen	epT.I.P.S. Standard 2 - 200 µl 0030000.870, Eppendorf
	epT.I.P.S. Standard 50 - 1000 µl 0030000.919, Eppendorf
	TipOne® S1111-3000 10 µl
	TipOne® S1111-0006 200 µl
	TipOne® S1111-2021 1000 µl
QIAShredder	Zellaufschlusssäulen 79654, Qiagen
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes 0,5 ml 0030 121.023, Eppendorf
	Safe-Lock Tubes 1,5 ml 0030 120.086, Eppendorf
	Safe-Lock Tubes 2 ml 0030 120.094, Eppendorf
	Safe-Lock Tubes 0,5 ml PCR clean 0030 123.301, Eppendorf
Spritzenfilter	Für HPLC Proben 0,2 µm AFO320352, Phenomenex
Sterilfilter	Minisart 0,2 µm 17573, Sartorius
Zellkulturflaschen	25 cm ² CE48.1, Roth
	75 cm ² 430641, Corning
Zellkultur Einsätze	ThinCert™ Zellkultur Einsatz für 24-Well-Platten mit 1 µm Porendurchmesser 662610, Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen	15 ml 430829, 50 ml 430791 und 430897, Corning

2.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Bestellnummer, Hersteller
10 mM dNTP mix	18427013, Invitrogen
2-Mercaptoethanol	M6250, Sigma
Brefeldin A	9972 S, New England Biolabs
Calcofluor-White	18909, Sigma
Dimethylsulfoxid (<i>cell culture grade</i>)	EMR385250, Biozol
di-Natriumhydrogenphosphat	P030.1, Roth
Ethanol (<i>pro analysi</i>)	HZI Lager
Ethanol (vergällt)	HZI Lager
Ethylendiamintetraacetat	27270, Riedel-de Haën
FBS	DE14-801F, Lonza
Formalin 10 %	HT501128, Sigma
Glycerin 87 % (<i>pro analysi</i>)	HZI Lager
Kaliumchlorid	4936, Merck
Kaliumhydrogenphosphat	4873, Merck
LightCycler [®] 480 SYBR Green I Master	4887352001, Roche
L-LDH,(hog muscle), suspension	10107085001, Roche
Natriumchlorid	3957.2, Roth
PolymorhPrep TM	1114683, Progen Biotechnik
ProLong [®] Gold Antifade Reagent with DAPI	p-36931, Invitrogen
Retinsäure, CAS [302-79-4]	0695, Tocris
RNase AWAY [®]	83931, Sigma
RNase free DNase Set	605157, Qiagen
RNase-ExitusPlus TM	A7153,0500, AppliChem
RPMI with L-Glutamine	BE12-702F, Lonza
Schwefelsäure 95 - 97 %	Merck
Superscript II	18064-014, Invitrogen
Trypanblau-Lösung 0,4 %	93595-250ML, Sigma
Trypsin-Versene	BE17-161E, Lonza
Tween [®] 20	9127.1, Roth

Wasser, Nuklease-frei	AM9938, Ambion
YPD-Broth	Y1375, Sigma

2.1.4 Kit-Systeme

Bezeichnung	Bestellnummer, Hersteller
LDH Cytotoxicity Detection Kit	11644793001, Roche
Human IL-1 α ELISA MAX TM Deluxe	434905, BioLegend
Human IL-6 ELISA MAX TM Deluxe	430505, BioLegend
Human IL-8 ELISA MAX TM Deluxe	431505, BioLegend
Human CCL2 (MCP-1) ELISA Ready-SET-Go!	88-7399-88, eBioscience
Human TNF α ELISA Ready-Set-Go!	88-7346-88, eBioscience
FlowCytomix Bead Assay:	
Th1/Th2 11plex Kit,	BMS810FF, eBioscience
IL-1 α simplex Kit	BMS80243FF, eBioscience
IFN- γ simplex Kit	BMS82001FF, eBioscience
RNeasy mini Kit	74106, Qiagen
Live Dead Viability Assay	L-3224, Invitrogen
BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit	54714, Becton Dickinson GmbH

2.1.5 Antikörper

Antikörper	Bezeichnung, Bestellnummer, Hersteller
TLR2	Monoclonal Antibody to human TLR4 - Azide free, MG-417E, Biomol
TLR4	Monoclonal Antibody to human TLR2 - Azide free, MG-416E, Biomol
Dectin 1	Human Dectin-1/CLEC7A Mab (Clone 259931), Mouse IgG2B, MAB1859, R&D Systems
CXCR4	Human CXCR4 (Fusin) Mab (Clone 44716), Mouse IgG2B, MAB172, R&D Systems
sek. Antikörper	Alexa488 sek Antibody goat, anti-mouse IgG, A11001, Invitrogen
IL-8	Alexa Fluor [®] 488 anti-human IL-8 Antibody, 511412, BioLegend

2.1.6 Primer

Das Primerdesign wurde mit der „Universal Probe Library Essay Design“ Software von Roche vorgenommen. Es wurden, wenn möglich, Intronüberspannende Primer gewählt, damit keine Amplifikation von genomischer DNA stattfinden konnte

Gene Symbol	Entrez GeneID	Left Primer	Right Primer
CCL2	6347	agtctctgccgcccttct	gtgactggggcattgattg
CLEC4E	26253	ggctcacctggtggttatca	tcatttttaggtttctttaggaaagg
CLEC7A	64581	ctttctegggccagact	ttgggtagctgtggttctga
CXCR1	3577	gctgttaagtcactctgatctctgac	tcagtttcagcaatggtttgat
CXCR4	7852	attgggatcagcatcgactc	caaactcacacccttgcttg
IL10	3586	tgccttcagcagagtgaaga	gcaaccaggttaaccctaaa
IL1R2	7850	ttgcctaaaaacttctgggaac	gcaacattgctcctgacaac
IL6	3569	caggagcccagctatgaact	gtgagtggctgtctgtgtgg
IL8	3576	agacagcagagcacacaagc	aggaaggctgccaagagag
TLR2	7097	tgtcattctttcttctgctaaga	ctaggtaggacagagaatgccttt
TLR4	7099	ccatggccttctctctct	ctgtgtggtttaggccaag
TLR8	51311	ccttgaaggaagcctttgaa	agcaggaaaatgcaggtcag
Housekeeper			
HPRT1		tgacettgatttattttgcatacc	cgagcaagacgttcagtcct
RPL13A		tgaccaataggaagagcaacc	agatgccccactcacaagat
GAPDH		agccacatcgctcagacac	gccaatacgaccaaacc

2.1.7 Puffer

1 x PBS	8 g/l NaCl
	0,2 g/l KCl
	0,24 g/l KH ₂ PO ₄
	1,42 g/l Na ₂ HPO ₄
	pH 7,4

ELISA Waschpuffer 1 x PBS
 0,05 % Tween 20

TE 1,21 g/l Tris
 0,37 g/l EDTA

2.1.8 Software

Bezeichnung	Bestellnummer, Hersteller
Gen5, Version 1.06, BioTek Instruments	Absorptionsmessung
Excel 2003 und 2007, Microsoft	numerische Datenanalyse
Word 2003 und 2007, Microsoft	Textverarbeitung
CellA 3.0, Olympus	Aufnahme und Bearbeitung mikroskopischer Bilder am Olympus Mikroskop
BZ8000 Viewer und Analyser, Keyence	Aufnahme und Bearbeitung mikroskopischer Bilder am Biozero BZ-8100 Mikroskop
LightCycler480 Steuersoftware	Messung der Fluoreszenzdaten der RT-PCR mit dem LightCycler480
ChemStation, Agilent	Messung der HPLC Chromatogramme und Auswertung
EndNote 8.02., Thomson	Literaturverwaltung

Die Auswertung der RT-PCR Daten erfolgte mit Hilfe der Web-basierten RT-PCR-Datenanalyse von SABiosciences: <http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>

2.1.9 Verwendete Zellkulturen und Hefen

In dieser Arbeit wurden die humanen Zelllinien A431 und HL-60 und der *C. albicans* Wildtypstamm SC5314 verwendet.

Zellen	Eigenschaften	Quelle
A431	humane vaginale Epithelzell-ähnliche epidermoide Carcinoma-Zelllinie von einem soliden Tumor einer 85 jährigen Frau. Die Zellen wachsen in adhärennten Monolayern.	DSMZ Nr.: ACC 91 [Giard <i>et al.</i> , 1973]
HL-60	humane promyeloische Krebszelllinie von einer 36 jährigen Frau mit akuter promyeloischer Leukämie. Die Suspensionszellen können durch Zugabe von Retinsäure oder DMSO zu Neutrophil-ähnlichen Zellen differenziert werden	ATCC Nr.: CCL-240 [Collins <i>et al.</i> , 1977; Breitman <i>et al.</i> , 1980]
<i>C. albicans</i> SC5314	sequenzierter Wildtyp	K. Sohn, Fraunhofer IGB, Stuttgart [Gillum <i>et al.</i> , 1984]

2.2 Methoden

Alle mikrobiologischen Arbeiten, bei denen die Sterilität gewährleistet werden musste, wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Alle hierbei verwendeten Medien und Materialien wurden entweder steril vom Hersteller bezogen oder durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 Minuten dampfsterilisiert. Die Glaspipetten für Arbeiten mit den tierischen Zellen wurden für 4 Stunden bei 180 °C hitzesterilisiert. Um eine Kontamination der Zellkulturen mit *C. albicans* zu vermeiden wurden die Arbeitsplätze, an denen mit *C. albicans* gearbeitet wurde, strikt von den Arbeitsplätzen der Zellkultur getrennt.

2.2.1 Zellzahlbestimmung nach Neubauer

Die Bestimmung der Zellzahl der tierischen Zellen und der Hefen erfolge mit einer *Neubauer improved* Zählkammer (Abb. 2.1). Dazu wurden die Zellen zwischen das Deckgläschen und die Zählkammer pipettiert und bei tierischen Zellen 4 Großquadrate (grau unterlegt) gezählt.

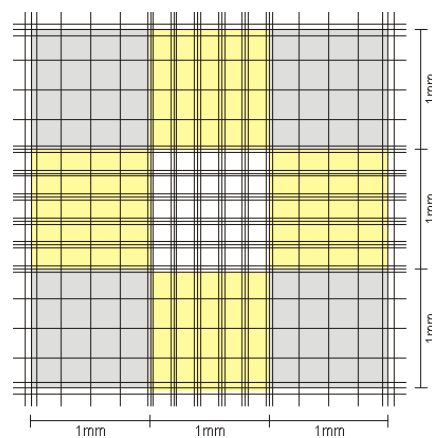


Abb. 2.1: Schematische Darstellung einer *Neubauer improved* Zählkammer
[Alcibiades, 2006]

Jedes dieser grauen Quadrate hat eine Fläche von 1 mm^2 , die Tiefe der Kammer beträgt 0,1 mm. Es ergibt sich pro Großquadrat ein Volumen von $0,1 \text{ mm}^3$ oder $0,1 \text{ }\mu\text{l}$. Die Zellzahl errechnet sich aus dem Mittelwert der Zellzahlen der 4 Großquadrate multipliziert mit dem Faktor 10^4 .

Wenn die Zellzahl von Hefen ermittelt werden sollte wurden 5 Kleinquadrate (weiß unterlegt) gezählt. Die Fläche eines Kleinquadrates beträgt $0,02 \text{ mm}^2$. Bei einer gleichbleibenden

Kammertiefe von 0,1 mm ergibt sich ein Volumen von $0,02 \text{ mm}^3$ oder $0,02 \mu\text{l}$. Um die Zellzahl pro ml zu bestimmen werden die Zellzahlen der 5 gezählten Kleinquadrate addiert und mit dem Faktor $5 * 10^4$ multipliziert.

2.2.1.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Für den Einsatz in Infektionsversuchen wurde von den HL-60 Zellen und den polymorphkernigen Granulozyten (PMN) die Lebendzellzahl bestimmt. Dazu wurden die Zellen 1:2 in 0,4 %iger Trypanblaulösung verdünnt. Der blaue polyanionische Azofarbstoff kann nur in tote Zellen eindringen, wodurch diese dunkelblau gefärbt werden. In lebende Zellen kann der Farbstoff nicht eindringen, so dass diese farblos bleiben.

2.2.2 Kultivierung von humanen Zellen

Die Kultivierung der humanen Zelllinien A431 und HL-60 erfolgte, wenn nicht anders genannt in RPMI-Medium, dem 10 % hitzeinaktiviertes FBS zugesetzt wurden (RPMI⁺-Medium). Die Hitzeinaktivierung des FBS erfolgte durch ein 30 minütiges Erhitzen auf 56°C . Die genaue Zusammensetzung des FBS schwankt stark von Charge zu Charge. Um eventuelle Effekte, die auf diese Schwankungen zurückzuführen wären, ausschließen zu können, wurde für alle Versuche FBS aus der gleichen Charge verwendet. Die Zellen wurden in einem CO_2 begasten Brutschrank bei einer relativen Luftfeuchte von 100 %, einer Temperatur von 37°C und einer CO_2 Konzentration von 5 % inkubiert.

2.2.2.1 Subkultivierung der A431 Zellen

Die Stammhaltung der adhärenenten A431 Zellen erfolgte in 25 cm^2 Zellkulturflaschen in 10 ml RPMI⁺-Medium. Die Zellen wurden alle 3 - 4 Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend für 5 min mit $500 \mu\text{l}$ Trypsin-EDTA im Brutschrank inkubiert. EDTA bildet mit dem für die Adhärenz der Zellen wichtigen zweiwertigen Kation Ca^{2+} einen Chelatkomplex. Dadurch werden die Bindungen der Zellen zu ihrem Untergrund gelockert. Die Protease Trypsin spaltet Polypeptide nach Arginin- und Lysinresten und löst somit die Zellen endgültig von ihrem Untergrund. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml frischem RPMI⁺-Medium aufgenommen und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. 2 ml dieser Zellsuspension wurden in eine neue Zellkulturflasche mit 8 ml frischem RPMI⁺-Medium überführt.

2.2.2.2 Subkultivierung HL-60 Zellen

Die Stammhaltung der Suspensionszellen HL-60 erfolgte ebenfalls in 25 cm² Zellkulturflaschen in 10 ml RPMI⁺-Medium. Die Zellen wurden alle 3 - 4 Tage umgesetzt indem die Zellen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 200 x g zentrifugiert wurden. Das alte Medium wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen in 10 ml frischem RPMI⁺-Medium vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt und die Zellen auf eine Zellzahl von $1,5 - 2 \cdot 10^5$ Zellen/ml in 10 ml Gesamtvolumen verdünnt.

2.2.3 Kryokonservierung humaner Zellen

Zur Kryokonservierung der A431 wurden 80 % konfluente Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl Trypsin für 5 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden in 10 ml RPMI⁺-Medium aufgenommen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Zur Kryokonservierung der HL-60 Zellen wurden Zellen aus 25 cm² Zellkulturflaschen mit einer Zelldichte von etwa $7 \cdot 10^5$ Zellen/ml verwendet. Die HL-60 Zellen wurden direkt in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zentrifugenröhrchen wurden für 5 min bei 200 x g pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, die Zellen in 1 ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. In einem speziellen mit auf 4 °C abgekühltem mit Isopropanol gefülltem Gefäß wurden die Kryogefäße im -80 °C Gefrierschrank langsam mit einer Abkühlrate von etwa 1 °C/min auf abgekühlt. Die Zellen wurden für mindestens 48 Stunden im -80 °C Gefrierschrank belassen und dann bei -196 °C im flüssigen Stickstoff gelagert.

2.2.3.1 Auftauen von kryokonservierten humanen Zellen

Zum Auftauen der kryokonservierten Zellen wurden die Zellen möglichst schnell unter schwenken im 37 °C Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden vorsichtig in ein vorgewärmtes 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 9 ml vorgewärmtes, CO₂ gepuffertes RPMI⁺-Medium zugetropft. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 200 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 10 ml frischem vorgewärmtem, CO₂ gepuffertem RPMI⁺-Medium vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Nach dem Überführen der Zellen in eine 25 cm² Zellkulturflasche wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert.

2.2.4 Differenzieren von HL-60 Zellen

Beim Differenzieren durchlaufen die HL-60 Zellen die Granulopoese. Dabei differenzieren die Promyelozyten zu Granulozyten. Zum Differenzieren der HL-60 Zellen wurden die Zellen mit einer Zelldichte von $2-3 \cdot 10^5$ Zellen/ml in 100 ml RPMI⁺-Medium in 175 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Zu den Zellen wurden entweder 1 µM Retinsäure oder 1,25 % DMSO zugesetzt. Die Zellen wurden für 6 Tage im Brutschrank inkubiert, wobei nach 4 Tagen ein Mediumwechsel stattfand. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen zweimal mit je 4 ml RPMI⁺-Medium gewaschen, mit Trypanblau gefärbt und anschließend gezählt (2.2.1.1). Ein Teil des Zellpellets wurde zur Zellkernfärbung mit DAPI (2.2.12.1) abgenommen.

2.2.5 Kultivierung von *Candida albicans*

Aufgrund der hohen Mutationsrate von *Candida albicans* wurde die Hefe nicht in Dauerkultur gehalten. Einen Tag vor dem eigentlichen Versuch wurde eine Kryokultur bei Raumtemperatur aufgetaut und in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit 20 ml YPD-Medium überführt. Die Zellen wurden bei 30 °C und 160 rpm für mindestens 6 Stunden inkubiert. 1 µl der Hefezellen wurde anschließend in 50 ml frisches YPD-Medium überführt und über Nacht (14-15 Stunden) bei 30 °C und 160 rpm inkubiert. Die Zellen befanden sich am nächsten Morgen in der exponentiellen Wachstumsphase. Dies wurde durch die Messung der OD überprüft. Wenn sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, durfte die gemessene OD nicht höher als 0,4 (gemessen mit dem µQuant) sein. Gegebenenfalls wurden die Hefen aus der Übernachtskultur 4 Stunden vor Infektionsbeginn auf eine OD von 0,2 (gemessen mit dem µQuant) verdünnt und weiter bei 30 °C und 160 rpm inkubiert.

Anschließend wurden die Hefen bei 10.000 rpm zentrifugiert, in 1 ml RPMI⁺- oder RPMI-Medium aufgenommen und die Zellzahl mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt (2.2.1).

2.2.5.1 Kryokonservierung von *Candida albicans*

Zur Kryokonservierung wurden dicht bewachsene über Nacht Kulturen verwendet. 750 µl *C. albicans* Suspension wurden zu 250 µl 80 %iger Glycerinlösung in ein Kryoröhrchen gegeben. Die Zellen wurden anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.6 Isolierung von polymorphkernigen Granulozyten aus menschlichem Vollblut

Die Isolierung der polymorphkernigen Granulozyten (PMN) erfolgte durch eine Dichtegradientenzentrifugation mit PolymorphprepTM. PMNs haben, mit Ausnahme von den Basophilen, eine Schwebedichte von 1,080 - 1,100 g/ml. Monozyten und Lymphozyten haben eine deutlich geringere Schwebedichte (1,060 - 1,078 g/ml) [www.axis-shield-density-gradient-media.com]. Diese Zellen würden sich also durch eine einfache Dichtegradientenzentrifugation trennen lassen. Allerdings haben Erythrozyten annähernd die gleiche Schwebdichte (1,087 - 1,110 g/ml) womit eine einfache dichtegradienten Trennung dieser Zellen von den PMNs nicht mehr möglich ist. Das in dieser Arbeit eingesetzte PolymorphprepTM besitzt eine sehr hohe Osmolalität (460 mOsm). Dadurch verlieren die Erythrozyten Wasser aus dem Zellinneren, wodurch die Zellen schrumpfen und ihre Schwebedichte sich weiter erhöht.

Das von klinisch unauffälligen Spendern stammende humane Blut wurde kurz vor der Versuchsdurchführung (max. 2 Stunden) durch den Betriebsarzt des HZI in EDTA-Monovetten abgenommen. Das EDTA dient als Gerinnungshemmer (Antikoagulans). Für die Dichtegradientenzentrifugation wurden 5 ml PolymorphprepTM mit 5 ml Vollblut in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen (20 ml PolymorphprepTM und 20 ml Vollblut in 50 ml Zentrifugenröhrchen) vorsichtig überschichtet. Die Röhrchen wurden vorsichtig in den Ausschwingrotor der Zentrifuge gestellt und bei 500 x g für 35 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Es ist wichtig die Bremse der Zentrifuge auszustellen, damit der Gradient nicht durch ein zu schnelles abbremsen des Rotors wieder zerstört wird. Nach der Zentrifugation konnten das Plasma und die mononuklearen Zellen abgenommen werden (Abb. 2.2). Anschließend können die PMNs geerntet werden, dabei ist darauf zu achten, dass keine Erythrozyten mit abgenommen werden.

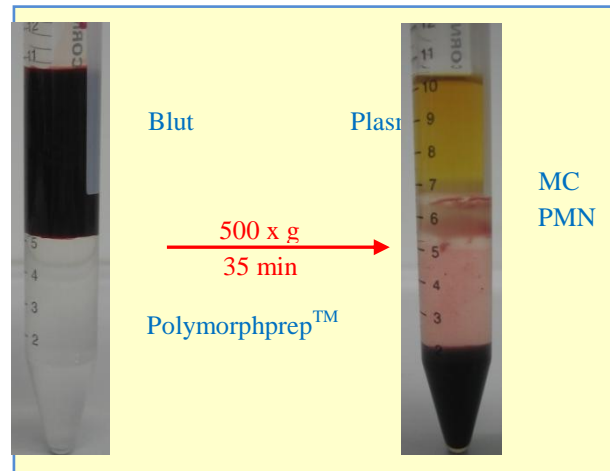


Abb. 2.2: Fraktionierung der einzelnen Blutbestandteile vor und nach der Dichtegradientenzentrifugation
 MC: mononukleare Zellen; PMN: polymorphkernige Granulozyten

Um die Osmolalität des menschlichen Körpers wieder einzustellen, wurden die PMNs in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit dem gleichen Volumen an 0,45 %iger NaCl-Lösung versetzt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 500 x g für 10 min, wurde eine hypotone Lyse durchgeführt um verbliebene Erythrozyten zu entfernen. Hierzu wurde der Überstand von den PMNs abgenommen und die Zellen für 30 sek in 3 ml eiskalter 0,2 %iger NaCl-Lösung resuspendiert. Nach der Zugabe von 3 ml 1,6 %iger NaCl und 4 ml PBS wurden die Zellen bei 200 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit je 4 ml RPMI⁺-Medium gewaschen, anschließend in 1 - 3 ml RPMI⁺-Medium aufgenommen und nach der Färbung mit Trypanblaulösung (2.2.1.1) gezählt.

2.2.7 Infektionsmodelle

Um die molekularen Antworten von den Epithelzellen auf eine Infektion mit *Candida albicans* untersuchen zu können, wurden verschiedene Infektionsmodelle etabliert. Dabei kamen einerseits Modelle in Zellkultureinsätzen, bei denen *C. albicans* und die Neutrophilen keinen direkten Kontakt zueinander hatten zum Einsatz und andererseits wurden alle drei Zelltypen (A431, *C. albicans* und PMN) mit direktem Kontakt inkubiert.

2.2.7.1 Infektionsmodell ohne direkten Kontakt von Epithel- und Immunzellen

Die verwendeten ThinCert™ Zellkultureinsätze haben eine poröse Polyethylenterephthalat Membran mit 1,0 µm Porendurchmesser. Durch diese Membran kann ein Mediumaustausch zwischen zwei Zellpopulation stattfinden, ohne dass ein direkter Kontakt zwischen den verschiedenen Zellen entsteht. Mit diesem System können Zell-Zell-Interaktionen, die nur durch ins Medium sekretierte lösliche Komponenten ausgelöst werden, beobachtet werden. Die in dieser Arbeit benutzten Einsätze im 24-Well Format hatten eine Kulturfläche von 33,6 mm² und ein Arbeitsvolumen von 0,1 ml - 0,4 ml.

Die A431 Epithelzellen wurden wie in 2.2.2.1 und 2.2.1 beschrieben geerntet, gezählt und 1×10^5 Zellen in 400 µl RPMI⁺-Medium pro Einsatz ausgesät (Abb. 2.3). Die Einsätze wurden in die Wells einer 24-Well-Platte gehängt und das Well mit 1 ml RPMI⁺-Medium gefüllt. Die Zellen wurden für 20 - 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Kurz vor der Infektion mit *Candida albicans* wurde das Medium im Einsatz und in dem Well gegen RPMI-Medium ausgetauscht. Die *C. albicans* Kultur wurde wie unter 2.2.5 beschrieben angesetzt. 1 ml der Hefe Kultur wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben, bei 12.000 x g zentrifugiert, in 1 ml RPMI aufgenommen und wie unter 2.2.1 beschrieben gezählt. Nun wurden die Epithelzellen mit der gewünschten Anzahl an *C. albicans* Zellen infiziert und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach 12 Stunden war die Vorinfektion beendet und die PMNs oder HL-60 Zellen wurden zu dem Modell gegeben. Dazu wurden die HL-60 Zellen wie unter 2.2.4 beschrieben differenziert oder die PMN wie unter 2.2.6 erläutert isoliert. Das Medium aus den Einsätzen wurde weitestgehend von den Epithelzellen entfernt und die Einsätze vorsichtig mit zwei Pinzetten aus dem Well gehoben, umgedreht und über Kopf in, mit 1 ml RPMI-Medium gefüllte 6-Well-Platten gestellt. Von den Immunzellen wurden (wenn nicht anders beschrieben) 1×10^6 Zellen in 25 µl RPMI⁺-Medium auf die Rückseite der Einsätze gegeben und die Platten vorsichtig in den Brutschrank gestellt.

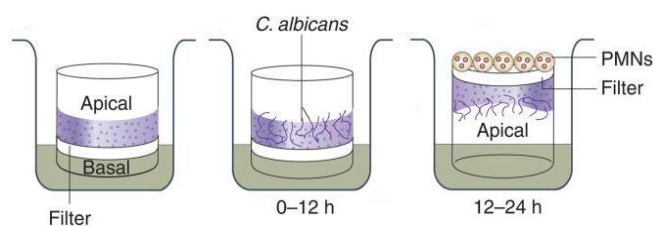


Abb. 2.3: Infektionsmodell ohne direkten Kontakt

Gezeigt ist die schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des Infektionsmodells ohne direkten Kontakt von Epithel- und Immunzellen.

Nach [Schaller *et al.*, 2006]

Alle 2-3 Stunden wurde kontrolliert, ob noch genügend Medium auf der Rückseite der Einsätze für die Neutrophilen vorhanden war und gegebenenfalls frisches RPMI⁺-Medium zu pipettiert.

Nach weiteren 12 Stunden wurde das Medium aus der 6-Well-Platte in 1,5 ml Reaktionsgefäße gefüllt und bis zur weiteren Verwendung (LDH-, Zytokinbestimmung) bei 4 °C oder -20 °C gelagert.

2.2.7.2 Infektionsmodell mit direktem Kontakt von Epithel- und Immunzellen im 24-Well Format

Bei diesem Infektionsmodell hatten die Immunzellen und die mit *C. albicans* infizierten Epithelzellen direkten Kontakt zueinander. Somit konnten die Antworten, die auf diesen direkten Interaktionen beruhen, untersucht werden. Die verwendeten 24-Well-Platten hatten eine Wachstumsfläche von 1,9 cm² und ein Arbeitsvolumen von 0,5 - 1,5 ml pro Well.

Die A431 Zellen wurden wie in 2.2.2.1 und 2.2.1 beschrieben geerntet und gezählt. $5 \cdot 10^5$ Zellen wurden in 1 ml RPMI⁺-Medium pro Well ausgesät und für 20 - 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit adhärten die Zellen am Boden des Wells, teilten sich aber nicht mehr. Es waren also am nächsten Tag weiterhin $5 \cdot 10^5$ Zellen in jedem Well vorhanden. Kurz vor der Infektion mit *C. albicans* wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch 1 ml frisches RPMI-Medium (bei Versuchen ohne Immunzellen) oder RPMI⁺-Medium (bei Versuchen mit Immunzellen) ersetzt. Die *C. albicans* Kultur wurde wie unter 2.2.5 beschrieben angesetzt. Auch hier wurde 1 ml der Hefe Kultur in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben bei 12000 x g zentrifugiert, in 1 ml RPMI oder RPMI⁺-Medium aufgenommen und wie unter 2.2.1 beschrieben gezählt. Nun wurden die Epithelzellen mit der gewünschten Anzahl an *C. albicans* Zellen infiziert und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Damit in allen Wells die gleiche Menge an Medium vorhanden war, wurde in die Wells, die nicht infiziert werden sollten, das gleiche Volumen an RPMI oder RPMI⁺-Medium ohne *C. albicans* zugegeben. Nachdem die Vorinfektion beendet war, wurden die PMNs oder HL-60 Zellen zu dem Modell zugegeben. Dazu wurden die HL-60 Zellen wie unter 2.2.4 beschrieben differenziert oder die PMN wie unter 2.2.6 erläutert isoliert. Die Zeit der Vorinfektion betrug zwischen 1 und 12 Stunden, die der weiteren Inkubation mit Neutrophilen zwischen 1 und 12 Stunden. Somit dauerte die gesamte Infektionszeit maximal 24 Stunden. Die Epithelzellen aus diesen Infektionsversuchen wurden für die RNA Isolation (2.2.11) verwendet. Das Medium wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße

gefüllt, bei 5000 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung (LDH-, Zytokin-, Glukosebestimmung) bei 4 °C oder -20 °C gelagert.

2.2.7.3 Infektionen mit direktem Kontakt von Epithel- und Immunzellen im 6-Well Format

Für die Rezeptoranalysen mittels Durchflusszytometrie wurden größere Mengen an Epithelzellen benötigt. Daher wurden die Infektionsversuche in 6-Well-Platten durchgeführt. Die verwendeten 6-Well-Platten hatten eine Wachstumsfläche von 9,6 cm² und ein Arbeitsvolumen von 2 - 5 ml pro Well.

Die A431 Zellen wurden wie in 2.2.7.3 beschrieben geerntet, ausgesät und infiziert. Es wurden nur die Zellzahlen auf die geänderte Wachstumsfläche und das Volumen angepasst. Von den A431 Zellen wurden $1,5 \cdot 10^6$ Zellen pro Well in 5 ml RPMI⁺-Medium ausgesät und diese mit $1,5 \cdot 10^6$ *C. albicans* infiziert. Von den PMNs wurden $1 \cdot 10^7$ Zellen und von den HL-60 Zellen wurden $0,7 \cdot 10^7$ Zellen verwendet. Die Zeit der Vorinfektion mit *C. albicans* betrug 4 Stunden. Anschließend wurden die Immunzellen zugegeben und die Zellen nach 1,5 und 4 Stunden geerntet und wie unter 2.2.10 beschrieben für die FACS-Analyse vorbereitet.

2.2.7.4 Behandlung von Epithelzellen mit Infektionsüberständen

Während der Infektion der Epithelzellen werden lösliche Substanzen von den Epithelzellen, *C. albicans* und den PMNs ins Medium sekretiert. Um zu analysieren welchen Einfluss diese Substanzen auf die Epithelzellen haben, wurden diese mit verschiedenen Infektionsüberständen behandelt. Die Überstände für die Behandlung der Epithelzellen wurden wie folgt gewonnen: in einer 6-Well-Platte wurden $1,5 \cdot 10^7$ PMN pro Well in 5 ml RPMI⁺-Medium ausgesät und mit $1,5 \cdot 10^6$ *C. albicans* infiziert und für 21 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Des Weiteren wurden auch PMNs ohne *Candida albicans* und *C. albicans* ohne PMNs auf die gleiche Weise inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen, sterilfiltriert und jeweils von 2 Wells, die die gleichen Zellen enthielten, gepoolt.

Das Einfrieren der Überstände wurde vermieden, damit keine eventuell enthaltenen thermolabilen Substanzen zerstört wurden.

Die A431 Zellen wurden wie in 2.2.7.2 beschrieben kultiviert. Der Überstand der kultivierten Epithelzellen wurde abgenommen und 500 µl des jeweiligen zuvor gewonnenen Überstands auf die Zellen gegeben. Da davon auszugehen war, dass in den Medien der Überstände keine Glukose mehr vorhanden war (3.3.5) wurden zu jedem Well noch 250 µl frisches RPMI⁺-

Medium gegeben. Dadurch sollten eventuell auftretende Veränderungen der Genexpressionen aufgrund von Nährstoffmangel vermieden werden. Die Epithelzellen wurden für 1,5 Stunden mit den Überständen inkubiert und anschließend die RNA wie in 2.2.11.1 beschrieben isoliert. Als Referenzprobe dienten A431 Zellen, die nur mit frischem RPMI⁺-Medium behandelt wurden.

2.2.8 LDH-Zytotoxizitätsassay

Das Maß der Zerstörung der Epithelzellen durch die Infektion mit *Candida albicans* wurde mit Hilfe des Cytotoxicity Detection Kit (LDH) von Roche bestimmt.

Die Zerstörung der Zellmembran durch Apoptose oder Nekrose ist mit einem Verlust der intrazellulären Bestandteile verbunden. Unter anderem wird dabei das normalerweise intrazellulär vorliegende Enzym Lactatdehydrogenase (LDH) ins Medium freigesetzt. Dieses Enzym ist auch außerhalb der Zelle relativ stabil.

In einem ersten Reaktionsschritt wird zunächst, katalysiert durch die LDH, Lactat zu Pyruvat oxidiert (Abb. 2.4). Dabei wird NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert. In einem zweiten, durch Diaphorase katalysierten Schritt, wird H/H^+ vom NADH/H^+ auf das schwach gelbe Tetrazoliumsalz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) übertragen, welches dabei zu rotem Formazan reduziert wird. Dieser Farbumschlag kann bei 492 nm photometrisch verfolgt werden. Die Menge an protoniertem Formazan ist proportional zu der Menge an freigesetzter LDH, welche wiederum proportional zu der Zahl toter Epithelzellen ist.

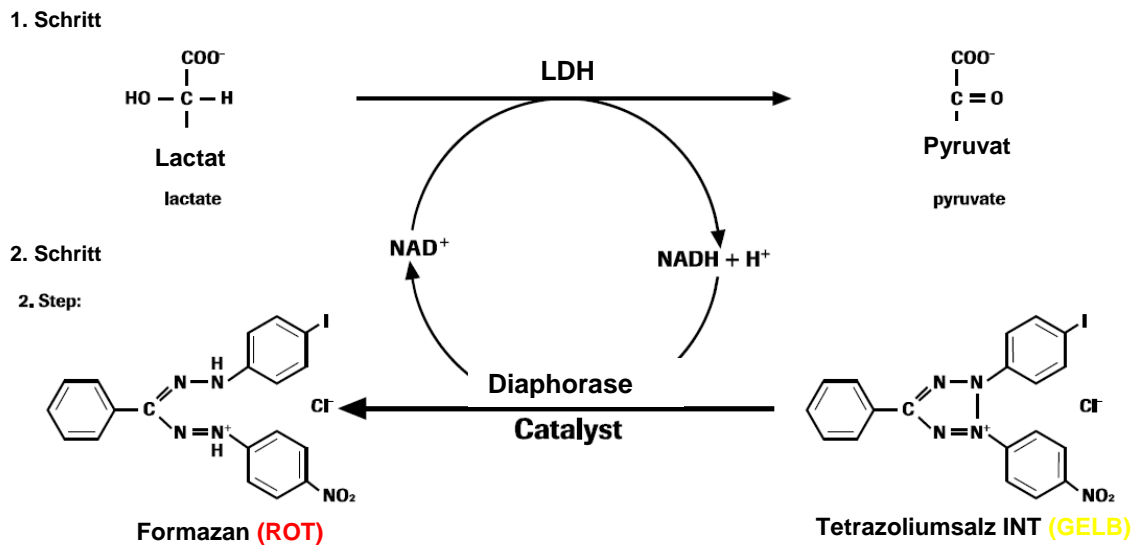


Abb. 2.4: Reaktionsprinzip des LDH Assays

Die ins Medium abgegebene Lactatdehydrogenase reduziert NAD⁺ zu NADH/H⁺ unter der Oxydation von Lactat zu Pyruvat. Im zweiten Reaktionsschritt wird durch eine weitere enzymatische Reaktion NADH/H⁺ wieder zu NAD⁺ oxidiert. Dabei wird das schwach gelbe Tetrazoliumsalz INT zu dem roten Formazan reduziert (nach: Roche Cytotoxicity Detection Kit (LDH) Version 09)

Die Überstände der jeweiligen Proben wurden von den Zellen abgenommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 5000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in 2 ml Probengläschen überführt und bis zur Messung bei 4 °C gelagert.

Jeweils 100 µl der Proben wurden in die oberste Reihe einer volumenreduzierten 96-Well-Platte gegeben und in den drei darunter liegenden Reihen jeweils 1:2 mit RPMI-Medium gemischt. Als Standard Kurve wurde eine Verdünnungsreihe von 50 µl reiner L-LDH mit einer Enzymaktivität von 0,55 U/ml - 0,0086 U/ml (0,5 µg/ml - 0,0078 µg/ml) in RPMI-Medium eingesetzt. Als Blindwert diente frisches RPMI-Medium. Zu den Proben und den Standardverdünnungen wurden jeweils 50 µl Reaktionsmix aus dem Test Kit gegeben und die Platte bei 37 °C für 20 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 492 nm und 620 nm photometrisch am µQuant bestimmt. Die Messung bei 620 nm diente der Kontrolle auf eventuell vorhandene Zellen oder Schwebstoffe, die die Messung bei 492 nm stören könnten. Nach Abzug der Blindwerte kann anhand der Standardkurve die LDH-Enzymaktivität der einzelnen Proben berechnet werden.

2.2.9 Nachweis von Zytokinen

Die Zytokine wurden im Zellkulturüberstand aus den Infektionsversuchen (2.2.7) bestimmt. Die Detektion der Zytokine erfolgte über Antikörper mit Immunoassays.

2.2.9.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ELISAs (*enzyme linked immunosorbent assay*) beruhen auf Antikörper-Antigen Wechselwirkungen und erlauben den quantitativen Nachweis von z.B. Zytokinen, Chemokinen oder Immunglobulinen. Die in dieser Arbeit durchgeführten ELISAs beruhen auf dem Prinzip des Sandwich-ELISAs. Zunächst werden die Wells einer Mikrotiterplatte mit dem sogenannten Capture Antibody (Fangantikörper) beschichtet. An diesen Antikörper kann dann das zu bestimmende Antigen aus der Probe binden und wird dadurch ebenfalls immobilisiert. Ein weiterer Antikörper, der mit Biotin gekoppelte Detektionsantikörper, bindet an einem zweiten Epitop des Antigens. Anschließend wird ein Avidin-Meerrettich-Peroxidase Kojungat an das Biotin gebunden. Das Enzym Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Umsetzung des in der Substratlösung enthaltenen farblosen Tetramethylbenzidin (TMB), wobei sich die Lösung blau färbt. Die Reaktion wird durch die Zugabe von verdünnter Schwefelsäure gestoppt. Dabei schlägt die Farbe der Lösung nach gelb um. Durch die photometrische Messung bei 450 nm (650 nm als Referenzwellenlänge) kann die umgesetzte Menge an TMB quantifiziert werden. Anhand einer Kalibrierkurve kann die in den Proben enthaltene Zytokinkonzentration berechnet werden.

Der Nachweis der Zytokine IL-8, IL-6 und IL-1 α erfolgte mit Kits von BioLegend und der des Zytokins TNF- α mit den Kits von eBioscience. Hierbei wurde im Wesentlichen nach den Protokollen der Hersteller verfahren. Es wurden jedoch alle Volumina halbiert, da die Analysen in volumenreduzierten 96-Well- durchgeführt wurden.

In einigen Proben war die IL-8 Konzentration so hoch, dass sie außerhalb des Gültigkeitsbereiches des ELISAs lag. Diese Proben mussten verdünnt werden. So wurden Proben, die aus der Coinkubation von *Candida albicans* und PMNs stammten, je nach Infektionsdauer bis zu einem Faktor von 1:200 verdünnt. Die Proben, die aus der Coinkubation von *C. albicans* und HL-60 stammten, wurden bis zu einem Faktor von 1:400 verdünnt. Zum Verdünnen wurde RPMI⁺-Medium verwendet. Die ELISA-Platten wurden mit

dem Mikrotiterplattenwaschgerät gewaschen. Die Absorption wurde mit dem μ Quant Plattenspektralphotometer gemessen.

2.2.9.2 FlowCytomix Bead Assay

Bei dem FlowCytomix Bead Assay werden mit spezifischen Antikörpern konjugierte Beads verwendet. Die Zytokine aus den Überständen werden durch die Antikörper an die Polystyrolkugeln gebunden. Ein mit Biotin gekoppelter Detektions-Antikörper wird hinzugefügt. An diesen bindet dann wiederum ein Streptavidin-PE Konjugat. Die Analyse der Beads erfolgt mittels Durchflusszytometrie. Das hier verwendete Kit enthielt Beads in zwei verschiedenen Größen, welche wiederum mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren. Dadurch konnten bis zu 20 verschiedene Zytokine simultan analysiert werden. Die Menge des gebundenen Zytokins konnte anhand der PE-Fluoreszenz bestimmt werden.

Das in dieser Arbeit verwendete Human Th1/Th2 11plex Kit von Bender MedSystems enthielt 11 Zytokine (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12(p70), TNF- α , TNF- β , IFN- γ). Zusätzlich dazu wurden noch zwei simplex Kits für die Detektion von IL-1 α und G-CSF verwendet. Die Zytokine mit dem jeweiligen Detektionslimit sind in Tab 2.1 angegeben. Mit der im Kit enthaltenen Standardlösung, die ein Gemisch der zu bestimmenden Zytokine enthielt, wurde eine Kalibrierkurve erstellt. Anhand dieser Kalibrierkurve kann die in den Proben enthaltene Zytokinkonzentration berechnet werden.

Die Durchführung des Assays erfolgte nach Herstellerangaben. Die Proben wurden mit dem FACSCanto analysiert.

Tab. 2.1: Sensitivitätsbereich der zu analysierenden Zytokine

Zytokin	Detektionslimit [pg/ml]
IL-1 β	4,2
IL-2	16,4
IL-4	20,8
IL-5	1,6
IL-6	1,2
IL-8	0,5
IL-10	1,9
IL-12(p70)	1,5
TNF- α	3,2
TNF- β	2,4
IFN- γ	1,6
IL-1 α	0,5
G-CSF	3,4

2.2.10 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie oder auch FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) handelt es sich um ein Nachweisverfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenproteinen und intrazellulären Molekülen. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf Antikörper-Antigen Interaktionen, bei denen Fluoreszenz-markierte Antikörper verwendet werden. Bei der Analyse wird jede Zelle aus einer Zellsuspension einzeln im Flüssigkeitsstrom von einem fokussierten Laserstrahl erfasst. Anhand des durch Größe (FSC, Forwardscatter) und Granularität (SCC, Sidescatter) der Zelle hervorgerufenen Streulichts kann auf die Art der Zelle geschlossen werden. Die Intensität des Fluoreszenzlichts liefert Aussagen über die Menge des Analyten. Durch die Verwendung von verschiedenen spezifischen Antikörpern, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, lassen sich simultan mehrere Antigene nachweisen. Durch die Erfassung des Streulichts lassen sich die einzelnen Zelltypen aus einer Suspension mit verschiedenen Zellpopulationen (in dieser Arbeit Epithelzellen, *C. albicans* und PMNs) voneinander getrennt darstellen und z.B. auf ihre Rezeptorexpression hin untersuchen.

In dieser Arbeit wurden unmarkierte Detektionsantikörper verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde über einen zweiten mit AlexaFluor488 gelabelten sekundären Antikörper eingeführt.

Zum Nachweis der Oberflächenrezeptoren TLR2, TLR4, Dectin 1 und CXCR4 auf den Epithelzellen wurden die Zellen wie unter 2.2.7.3 beschrieben kultiviert.

Nach Ablauf der Infektionszeit wurden die Zellen in den Wells zweimal mit PBS gewaschen und mit 500 µl/Well Trypsin vom Boden abgelöst. Die Zellen wurden in 1 ml PBS + 2 % FBS aufgenommen, in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 2000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 600 µl PBS + 2 % FBS aufgenommen und diese Suspension auf 6 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Zellen in dem ersten Reaktionsgefäß dienten als Kontrolle für unspezifische Fluoreszenzsignale, die von den Zellen ausgehen. Diese Proben wurden analog zu den anderen behandelt, jedoch ohne Antikörperzugabe. Die Zellen in dem zweiten Reaktionsgefäß dienten zur Kontrolle auf unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers, hier wurde nur der sekundäre Antikörper und kein Detektionsantikörper verwendet. Die Gefäße 3 - 6 wurden mit je einem spezifischen Detektionsantikörper und dem sekundären Antikörper behandelt.

Zu den Zellen in den Gefäßen 3-6 wurden je 100 µl Antikörperlösung (je 2,5 µg Antikörper pro Probe) und zu den Gefäßen 1 und 2 weitere 100 µl PBS + 2 % FBS gegeben und die Zellen für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 500 µl PBS + 2 % FBS zu den Zellen gegeben und diese bei 2000 x g für 5 min zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch zwei weitere Male wiederholt. Die Zellen wurden wieder in 200 µl PBS + 2 % FBS resuspendiert und in die Gefäße 2 - 6 wurden zusätzlich 4 µg von dem mit Alexa Fluor488 markierten sekundären Antikörper gegeben. Die Zellen wurden eine weitere Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend wieder dreimal mit je 500 µl PBS + 2 % FBS gewaschen. Die Zellen wurden in 500 µl PBS mit 1 % Formalin fixiert, in 5 ml FACS Röhrchen überführt und über Nacht bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Die Messung der Proben erfolgte am FACSCanto mit einem Argon-Ionen-Lasers (488 nm).

2.2.11 Genexpressionsanalysen

Für die Genexpressionsanalysen wurden die Zellen im 24-Well-Format (2.2.7.2) kultiviert. Hierbei lag die Dauer der Vorinfektion mit *C. albicans* zwischen 4 und 6 Stunden. Die anschließende Cokultivierung mit infizierten Epithelzellen und *C. albicans* lag bei weiteren

30 min bis 12 Stunden. Um einen Abbau der empfindlichen RNA und cDNA zu vermeiden wurden alle Schritte, in denen mit RNA oder cDNA gearbeitet wurde nur mit DNase und RNase freien Materialien und Chemikalien und auf Eis durchgeführt. Die Arbeitsfläche, Pipetten und Handschuhe wurden mit RNase AWAY® und RNase-ExitusPlus™ von möglicherweise vorhandenen RNasen gereinigt.

2.2.11.1 Isolierung humaner RNA

Die Zellen in den Wells der 24-Well-Platte wurden zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen und anschließend die RNA mit Hilfe des RNeasy mini Kits nach dem Protokoll zur Isolation von RNA aus tierischen Zellen gewonnen. Die Homogenisierung des Zell-Lysats wurde mit QIAshredder-Säulen durchgeführt. Da die RNA auch für eine RT-PCR eingesetzt werden sollte, wurde ein zusätzlicher DNase-Verdau noch in den Säulen durchgeführt. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch am NanoDrop1000 bestimmt. Da die gewonnene RNA leicht durch RNasen zersetzt wird, wurde vor den Genexpressionsanalysen die Intaktheit der RNA bestimmt. Die Qualität/Intaktheit der RNA wurde von Array Facility des HZI mit einem RNA 6000 Nano Chip von Agilent am Agilent 2100 Bioanalyzer bestimmt. Es wurden nur Proben verwendet deren RNA Integrity Number (RIN) gleich 10 betrug. Die RIN ist ein Maß für die Intaktheit (Intigrität) der RNA Fragmente. Die RIN-Skala reicht von 1 (völlig zersetzt) bis 10 (völlig intakt). Ein Beispiel für Intakte RNA mit einer RIN gleich 10 und degradierter RNA mit einer RIN gleich 1,4 ist in Abb. 2.5 dargestellt.

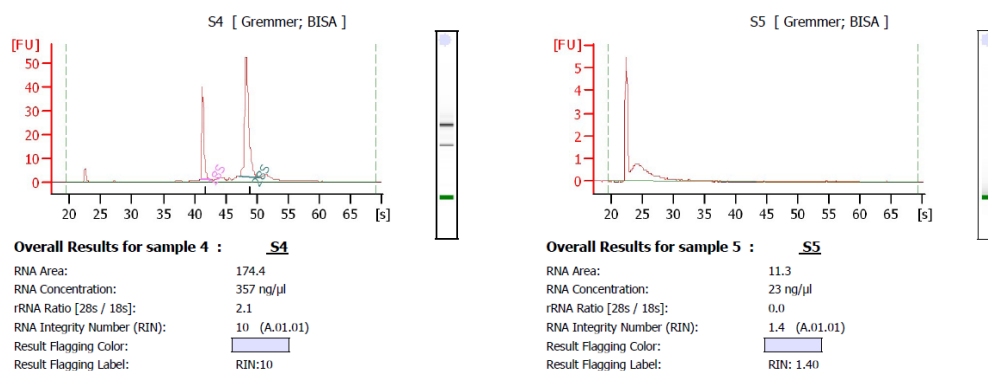


Abb. 2.5: Elektropherogramm der RNA Qualitätskontrolle.

Die Probe S4 zeigt ein Elektropherogramm mit guter RNA Qualität. Das Verhältnis von 28S:18S RNA beträgt 2,1:1. Das theoretische Maximum liegt bei 2,7:1, eine Probe mit guter RNA Qualität sollte ein Verhältnis von > 2:1 aufweisen. Das Elektropherogramm der Probe S5 zeigt eine sehr geringe RNA Konzentration, die fast vollständig degradiert ist. Es konnte keine 18S und 28S RNA nachgewiesen werden.

2.2.11.2 Real Time-PCR

Die Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (Real Time - Polymerase Chainreaktion; RT-PCR) ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Genexpression. Das Prinzip beruht auf der direkten Detektion der PCR Produkte in Echtzeit durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green. Dieser Farbstoff zeigt im ungebundenen Zustand keine Fluoreszenz, erst wenn er in doppelsträngige DNA interkaliert emittiert er nach Anregung mit UV-Licht eine grüne Fluoreszenz. Nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen. Lag die Fluoreszenz über einem bestimmten Schwellenwert galt die Probe als positiv. Da bei jedem Zyklus das Amplikon verdoppelt wird, kann durch die Fluoreszenz auf die Ausgangskonzentration der DNA geschlossen werden. Je früher der Schwellenwert erreicht wird, desto mehr Ausgangs-DNA war vorhanden. Die Zyklenzahl, bei der der Schwellenwert erreicht wurde wird als Ct-Wert bezeichnet.

Ein Nachteil der Messung mit SYBR Green ist die geringe Spezifität. Es werden auch Verunreinigungen durch Primerdimere angezeigt. Darum wurde nach jeder RT-PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wird das RT-PCR Produkt langsam von 65 °C auf 97 °C erhitzt, wobei die doppelsträngige DNA in einzelsträngige aufgebrochen und das SYBR Green wieder freigesetzt wird. Das spezifische RT-PCR Produkt weist einen höheren Schmelzpunkt auf als die Primerdimere, was sich in zwei unterschiedlichen Peaks in dem Schmelzkurvendiagramm zeigt.

Bei diesem Verfahren werden die Gen-Expressionsmuster verschiedener Proben miteinander verglichen. Vergleicht man die Expression behandelter Zellen mit derer unbehandelter Zellen lassen sich die Gene identifizieren, die aufgrund einer bestimmten Behandlung der Zellen exprimiert wurden.

Vor der Durchführung der RT-PCR musste die RNA zunächst noch in cDNA umgeschrieben werden. Die cDNA Synthese wurde mit dem Enzym reverse Transkriptase und zwei verschiedenen Primern durchgeführt. Der Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer bindet an den poly-A Schwanz von mRNA, die reverse Transkription der RNA startet also am 3'-Ende der RNA. Bei sehr langen Genen kann es passieren, dass die Transkriptase von der RNA „abfällt“ und das Gen nicht vollständig transkribiert wird. Der random Primer besteht aus hauptsächlich hexameren Primern mit zufälliger Sequenz. Diese binden an unbestimmten Regionen der RNA, so dass ein großer Teil der RNA erfasst (auch die 5'-Enden) und in cDNA umgeschrieben wird, jedoch in vielen einzelnen Stücken.

Dazu wurden 1 - 3 µg RNA mit RNase freiem Wasser auf ein Endvolumen von 11 µl in einem 0,2 ml PCR-Gefäß verdünnt. Zu der RNA wurden 0,25 µg Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer und 1,5 µg random Primer zugegeben. Die RNA wurde zum denaturieren für 10 min bei 70 °C im Thermocycler denaturiert und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Zu jeder Probe wurden 4 µl 5x first strand Puffer, 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl dNTPs (10 mM) und 1 µl SuperscriptTM II reverse Transkriptase (10 U) zugegeben. Die Proben wurden für 1 Stunde bei 42 °C im Thermocycler inkubiert und anschließend wieder auf 4 °C abgekühlt. Jeder Ansatz wurde mit 8 µl TE-Puffer pro µg eingesetzter RNA versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für die RT-PCR wurden bis zu 15 verschiedene Primerpaare auf einmal untersucht. Die Sequenzen der Primer sind unter 2.1.6 aufgeführt. Vor der RT-PCR wurden der jeweilige forward und der dazugehörige reverse Primer mit einer Konzentration von 2 pmol/µl pro Primer gemischt. Die cDNA wurde 1:2,5 verdünnt. In einer 384-Well RT-PCR Platte wurden abweichend vom Protokoll nur 10 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Es wurden in jedes Well je 2,5 µl Primerpaar, 2,5 µl cDNA und 5 µl SYBR Green Mastermix gegeben. Außerdem wurde bei jeder Messung eine Kontrolle ohne cDNA angesetzt. Die Proben und die Kontrollen wurden als Doppelbestimmung gemessen. Die Platte wurde mit einer Folie sorgfältig zugeklebt und die Platte 2 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Die Messung der Proben wurde mit dem LightCycler480 in der Array Facility des HZI nach dem Standardprotokoll „Roche Standard SYBR Green 384 Well“ durchgeführt:

Denaturierung	95 °C	5 min	} 45 Zyklen
Denaturierung	95 °C	10 sec	
Hybridisierung	60 °C	10 sec	
Elongation	72 °C	10 sec	

Zum Abschluss der Messung wurde noch die Schmelzkurve aufgenommen. In jedem Versuch wurde mindestens ein sogenanntes housekeeping Gen mit gemessen. Housekeeper sind Gene, die unabhängig von der Behandlung der Zelle immer gleich exprimiert werden. Durch ein mit einbeziehen dieser Gene werden die Werte der einzelnen Proben normalisiert und somit ein ins Verhältnis setzten der Proben möglich.

2.2.11.3 Ganz Genom Analyse mittels Microarray

Mittels der Microarray Technik lässt sich simultan die Expression einer großen Anzahl an Genen bestimmen. In dieser Arbeit wurden *Whole Human Genome 4x44k V1* Microarrays von Agilent verwendet. Die Genexpressionsbestimmung mit den Microarrays wurde von der Array Facility des HZI nach dem *Quick Amp Labeling Kit Sample Preparation* - Protokoll von Agilent durchgeführt. Die Auswertung und Analyse der Genexpressionsdaten wurden mit der Unterstützung von Dr. Anna Buschart, Biologische Systemanalyse, HZI, durchgeführt. Als signifikant reguliert werden Gene angesehen, wenn diese sich mindestens um den Faktor 2 (fold change > 2) in ihrer Regulation geändert haben und einen angepassten p-value (berechnet nach dem Verfahren von Benjamini und Hochberg) [Benjamini & Hochberg, 1993] von maximal 0,01 aufwiesen.

2.2.12 Fluoreszenz-Färbungen

Bei der Fluoreszenz-Färbung können unterschiedliche Zellen, Vitalitätszustände oder intra- und extrazelluläre Zellbestandteile durch Fluoreszenzfarbstoffe sichtbar gemacht werden. Die Unterscheidung beruht dabei auf unterschiedlichen Bindungsaffinitäten, enzymatischen Aktivitäten oder Zellmembranzuständen. Sollen mehrere Komponenten gleichzeitig analysiert werden, müssen Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, die Fluoreszenzlicht mit unterschiedlichen Wellenlängen emittieren.

Für die Fluoreszenz Färbungen wurden die Zellen wie unter 2.2.7.2 beschrieben kultiviert. Es wurden aber anstatt der 24-Well-Platten Cellview™ Zellkulturschalen mit 4 Kompartimenten verwendet. Jedes Kompartiment hat, wie die Wells der 24-Well-Platte, eine Wachstumsfläche von 1,9 cm². Die Zellkulturschalen haben einen Glasboden aus Borosilikatglas, wodurch eine maximale Planarität erreicht wird. Dieser Boden ermöglicht eine bessere Auflösung für die Fluoreszenzmikroskopie.

2.2.12.1 Zellkernfärbung mit DAPI

Zur Kontrolle der Differenzierung der HL-60-Zellen und der isolierten PMNs wurden deren Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) angefärbt. Die zu Granulozyten differenzierten HL-60 Zellen sowie die primären Neutrophile lassen sich anhand ihrer segmentierten Kerne leicht erkennen. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI bindet an die DNA in den Zellkernen und emittiert bei Anregung mit UV-Licht eine blaue Fluoreszenz. Dadurch wird die Form und Größe der Zellkerne unter dem Fluoreszenz Mikroskop sichtbar gemacht.

Zur Einbettung der Zellen wurde das Einbettungsmittel *ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI* verwendet. In diesem Einbettungsmittel ist das DAPI bereits enthalten, so dass die Zellen gleichzeitig fixiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt werden konnten. Dazu wurde ein Tropfen des Einbettungsmittels auf einen Objektträger gegeben und 1 - 2 µl der pelletierten Zellen aus Abschnitt 2.2.4 oder 2.2.6 mit dem Tropfen vermengt. Das Präparat wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet und anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

2.2.12.2 Lebend/Tot-Färbung

Die Lebend/Tot-Färbung (Live-Dead-Viability-Assay) dient der gleichzeitigen Bestimmung von lebenden und toten Zellen anhand von unterschiedlich farbigen Fluoreszenzfarbstoffen. Lebende Zellen besitzen eine intrazelluläre Esterase-Aktivität. Das Enzym Esterase katalysiert die Umsetzung des membrangängigen nicht fluoreszenten bis-Acetoxy-methylester von Calcein (Calcein-AM) zum grün fluoreszierenden Calcein (ex/em ~495 nm/~515 nm) (Abb. 2.6). Das umgesetzte Calcein verbleibt in der Zelle und färbt diese somit mit einer grünen Fluoreszenz an. Da tote Zellen keine aktiven Esterasen mehr besitzen werden nur die lebenden Zellen angefärbt.

Die Färbung der toten Zellen erfolgt mit Ethidium Homodimer-1 (EthD-1). EthD-1 kann nur in Zellen mit beschädigter Zellmembran eindringen. Dort bindet es an die DNA, wodurch die rote Fluoreszenz des EthD-1 um das 40 fache verstärkt wird (ex/em ~495 nm/~635 nm). Lebende Zellen mit intakter Zellmembran werden nicht von EthD-1 angefärbt.

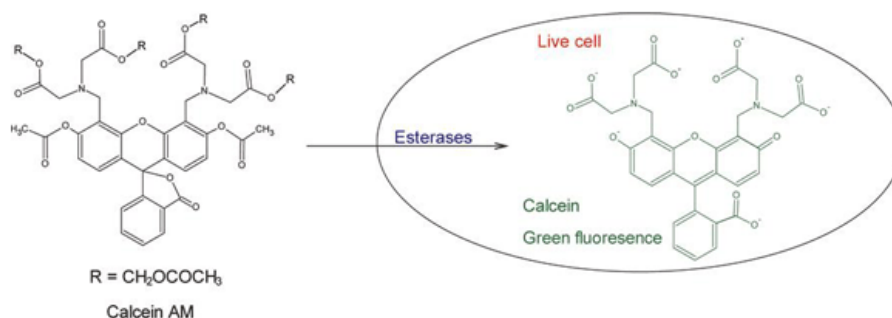


Abb. 2.6: Katalytische Umsetzung von Calcein AM zu Calcein

Das Enzym Esterase katalysiert die Abspaltung der Acetoxy-methylgruppen vom Calcein bis-Acetoxy-methylester zu Calcein, wodurch lebende Zellen mit einer grünen Fluoreszenz angefärbt werden.

1 µl Calcein AM und 2 µl Ethidium Homodimer-1 (je 2 µM) wurden in 2 ml PBS verdünnt. Nach der Infektion wurde das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen vorsichtig

mit 100 µl PBS gewaschen. Zu jedem Kompartiment wurden 100 µl der Färbelösung zugegeben und die Zellen bei Raumtemperatur für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden weitere 2-mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 300 µl pro Kompartiment Fixierlösung (PBS + 1 % Formalin) fixiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.2.12.3 Intrazelluläre Interleukin 8-Färbung

Zur Analyse welche Epithelzellen IL-8 exprimieren, wurde das IL-8-Protein mit einem spezifischen AlexaFluor488 markiertem IL-8-Antikörper gefärbt. Die Epithelzellen sekretieren IL-8 normalerweise ins Medium, da es aber intrazellulär angefärbt werden sollte, wurde die Sekretion durch Zugabe des Sekretionsinhibitors Brefeldin A inhibiert. Brefeldin A inhibiert den Proteintransport vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum. Der Golgi-Apparat zerfällt, was einen Rücktransport der Proteine zum Endoplasmatischen Retikulum zur Folge hat. Die Proteine akkumulieren am Endoplasmatischen Retikulum und können dort intrazellulär nachgewiesen werden.

Damit der Antikörper in die Zelle eindringen konnte mussten die Zellen vorher permeabilisiert werden. Dazu wurde das *BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit* von BD verwendet. Nach 1 Stunde Infektion mit *C. albicans* und ggf. Zugabe der PMNs wurden 0,5 µg Brefeldin A pro Kompartiment zu den Epithelzellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend für weitere 4 - 6 Stunden inkubiert. Das alte Medium wurde abgenommen und die Zellen 2-mal vorsichtig mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 100 µl/Kompartiment Fixation/Permeabilization Lösung bei 4 °C für 20 min inkubiert. Nach zweimaligen waschen mit je 250 µl 1 x BD Perm/Wash Puffer wurden 5 µl IL-8 Antikörper in 100 µl Perm/Wash Puffer pro Well zugegeben. Die Zellen wurden weitere 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert und abschließend noch zweimal mit 1 x BD Perm/Wash Puffer gewaschen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.2.12.4 Candida albicans Färbung

Calcofluor-White ist ein Fluoreszenzfarbstoff der an Cellulose- und Chitinverbindungen bindet. Bei *Candida albicans* bindet er spezifisch an das Zellwandchitin, die humanen Zellen bleiben weitestgehend ungefärbt. Die Färbung der *C. albicans* wurde nach der Färbung der Epithelzellen durchgeführt. Dazu wurde die Fixierlösung (2.2.12.2) oder der 1 x BD Perm/Wash Puffer (2.2.12.3) von den Zellen abgenommen und 100 µl Calcofluor-White (1 g/l) pro Kompartiment zugegeben. Die Zellen wurden für 30 Sekunden mit dem Farbstoff

inkubiert und anschließend bis zur sichtbaren Entfärbung mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden wieder bis zur weiteren Verwendung mit 300 µl Fixierlösung bei 4 °C gelagert.

2.2.13 Glukosebestimmung mittels HPLC-Analyse

Der Glukosegehalt in den Infektionsüberständen wurde mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatographie*, HPLC) bestimmt. Das Trennprinzip der HPLC beruht auf der Verteilung des Probengemischs zwischen zwei Phasen. Die stationäre Phase besteht aus festen Teilchen oder flüssigkeitsbelegten Trägern und trennt die Probe in ihre Bestandteile auf, indem sie die verschiedenen Stoffe der Probe unterschiedlich lange zurückhält. Die mobile Phase besteht aus einem Lösemittel, welches das Probengemisch durch die Säule spült und eventuell gebundene Substanzen des Probengemischs wieder von der Säule eluiert. Durch das Zusammenspiel der beiden Phasen gelangen die Substanzen des Probengemischs nacheinander zum Detektor und werden dort analysiert. Anhand der Retentionszeit und der Peakhöhe kann eine Substanz qualitativ wie auch quantitativ bestimmt werden.

Die Überstände der Infektionen wurden wie in 2.2.7.2 beschrieben gewonnen und die Zellen abzentrifugiert. Um Zellreste und andere Schwebstoffe abzutrennen wurden 500 µl der Proben durch 0,2 µm Filter filtriert und 200 µl der Proben in eine 96-Well-Platte vorgelegt. Die Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert. Die chromatographische Auftrennung der Proben erfolgte bei 60 °C durch eine ROA-Organic Acid H⁺ (8 %) Säule die nach dem Prinzip der Ionenausschlusschromatographie arbeitet. Als Laufmittel wurde 2,5 µM H₂SO₄ mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min verwendet. Die Detektion der Glukose erfolgte mit einem Dioden Array Detektor. Die Analyse und Auswertung der Proben wurde von Daniela Evers, Biologische Systemanalyse, HZI durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

In den Legenden der Grafiken werden die Zellarten angegeben, die jeweils miteinander in Cokultur inkubiert wurden. Zum Beispiel werden die Proben, bei denen A431 Epithelzellen mit *Candida albicans* infiziert wurden und zu denen PMNs als Vertreter des Immunsystems hinzugegeben wurden, als A431 + *Candida* + PMN (oder als A431 + Caa + PMN) bezeichnet; Kontrollen bei denen nur *C. albicans* und PMNs zusammen inkubiert wurden, werden als *Candida* + PMN (oder als Caa + PMN) und A431 Zellen ohne eine Infektion und ohne Immunzellen werden als A431 bezeichnet. Bei dieser Arbeit wurden verschiedene Medien jeweils mit und ohne 10 % FBS verwendet. Wenn das RPMI-Medium 10 % FBS enthielt, wird dieses Medium im Folgenden als RPMI⁺-Medium bezeichnet. RPMI⁺-Medium wurde nur verwendet, wenn PMN oder HL-60 in den Versuchen verwendet wurden. Versuche ohne Immunzellen wurden mit FBS freiem RPMI-Medium durchgeführt. Für jeden Versuch wurde aber das gleiche Medium für alle Zellen verwendet. Wenn in einem Versuch auch Proben mit Immunzellen untersucht werden sollten, dann wurden auch die Proben, in denen nur A431 oder A431 + *Candida* kultiviert wurden, in RPMI⁺-Medium kultiviert.

3.1 Grundlagen der *in vitro* Infektionsmodelle

Bevor mit den eigentlichen Untersuchungen der molekularen Antworten der Epithelzellen auf eine Infektion mit *Candida albicans* begonnen werden konnte, musste das Infektionsmodell etabliert werden. Dazu gehörte die Ermittlung des geeigneten *C. albicans* Stammes und der MOI.

3.1.1 LDH Sekretion während der Infektion mit verschiedenen *Candida albicans* Stämmen

Verschiedene *Candida albicans* Wildtyp-Stämme wurden auf die durch sie verursachte Epithelzellschädigung untersucht. Hierbei wurden die Wildtyp-Stämme SC5314, DSM-1386, und DSM-1577 verwendet. Es wurden außerdem zwei verschiedene Zellkulturmedien, RPMI-Medium und DMEM-Medium, getestet, die beide ohne die Zugabe von FBS verwendet wurden. Ziel war es, die Kombination aus *C. albicans* Stamm und Medium zu ermitteln, die den größten Schaden in den Epithelzellen hervorrief und somit am besten für die Untersuchungen der Infektionen geeignet war. Die A431 Zellen wurden wie in 2.2.7.2 und die

C. albicans Stämme wie in 2.2.5 beschrieben kultiviert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte A431 Zellen.

Die Epithelzellen wurden mit jeweils $5 \cdot 10^5$ *C. albicans* Zellen infiziert und für 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die relativen LDH Mengen bestimmt (2.2.8). Bei der LDH Messung wurde keine Standardkurve mit aufgenommen, stattdessen wurden die gemessenen Absorptionen miteinander verglichen (Abb.3.1).

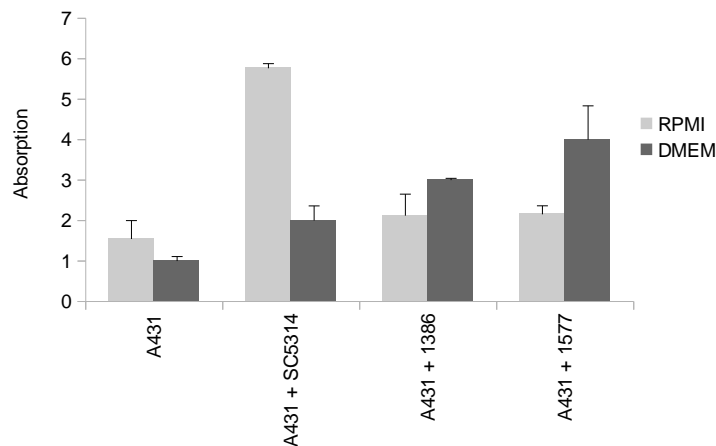


Abb. 3.1: Freigesetzte LDH Konzentrationen während der Infektion mit verschiedenen *C. albicans* Stämmen

Die Menge an freigesetzter Lactatdehydrogenase wurde infolge der Infektion mit *C. albicans* unter Verwendung verschiedener Zellkulturmedien bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen biologischen Replikaten. Die Proben A431 + SC5314 in RPMI und A431 + 1577 in DMEM waren vor der Analyse um den Faktor 2 verdünnt worden und die Messwerte anschließend wieder mit 2 multipliziert.

Es zeigte sich, dass der Wildtyp SC5314 im RPMI-Medium die größte Zerstörung in der Epithelzellschicht anrichten konnte (Abb. 3.1). Die Stämme DSM-1386 und DSM-1577 zeigten eine geringere Zellschädigung. Dies lässt sich möglicherweise durch die verminderte Hyphenbildung dieser beiden Stämme erklären. In Abb. 3.2 wird deutlich, dass nur die SC5314 in der Lage war, die Epithelzellschicht nahezu vollständig mit Hyphen zu überwachsen (Bild B und F). In den Proben mit dem Stamm DSM-1577 wurde die zweithöchste LDH Konzentration ermittelt. Allerdings war hier die Zellschädigung im DMEM Medium höher als im RPMI-Medium. Dieser *C. albicans* Stamm war auch in der Lage Hyphen zu bilden, jedoch waren diese weitaus kürzer als bei dem Stamm SC5314 (Bild D und H). Der *C. albicans* Stamm DSM-1386 hat keine Hyphen ausgebildet. In den Proben die diesen Stamm enthielten wurde nur eine geringe Erhöhung der LDH Konzentration im Überstand festgestellt. Der Vergleich der Bilder B (SC5314 in RPMI) und F (SC5314 in

DMEM) zeigt, dass die Hyphen im DMEM-Medium größtenteils von den Epithelzellen abgelöst waren und als dunkle unscharfen „Wolken“ im Medium schwammen (Bild F). In Bild B hafteten die Hyphen dagegen direkt auf den Epithelzellen. Die Fähigkeit der *C. albicans* die Epithelzellschicht zu zerstören hing also stark von der Fähigkeit der Hefe zur Hyphenbildung ab.

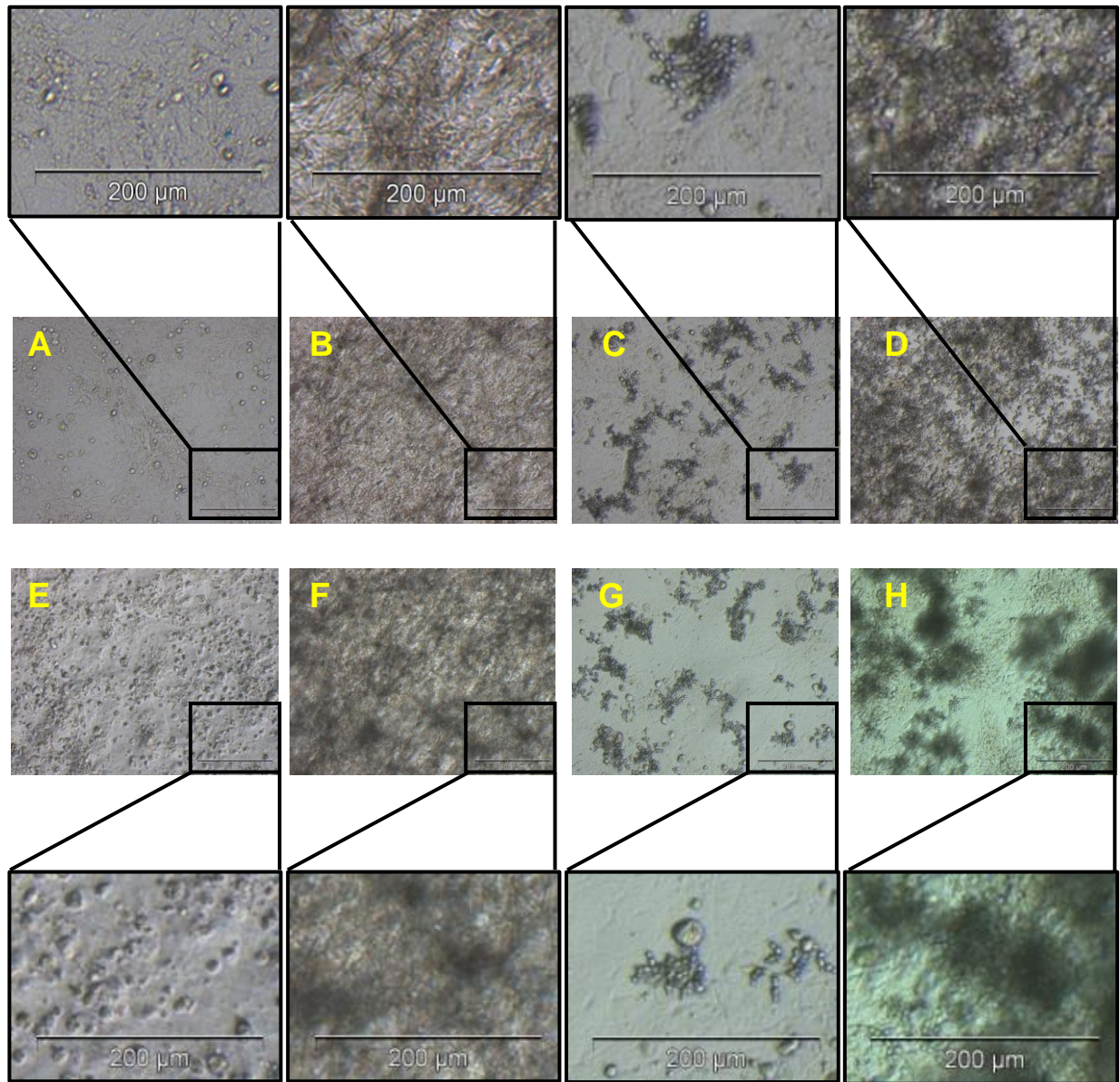


Abb. 3.2: Hyphenbildung während der Infektion von A431 Epithelzellen mit verschiedenen *C. albicans* Stämmen

Die A431 Epithelzellen wurden für 16 Stunden mit den verschiedenen *C. albicans* Stämmen infiziert

A - D: RPMI-Medium; E - H: DMEM-Medium; A, E: A431; B, F: SC5314 infizierte A431; C, G: DSM-1386 infizierte A431; D, H: DSM-1577 infizierte A431; Balken - 200 µm

Die Bilder befinden sich auf der dieser Arbeit beigelegten DVD.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im weiteren Verlauf der Arbeit der *C. albicans* Stamm SC5314 und RPMI-Medium eingesetzt.

3.1.2 Einfluss der multiplicity of infection und der Infektionszeit auf die Epithelzellschädigung

Um zu ermitteln wie stark die Zellschädigung von der für die Infektion verwendeten *Candida albicans* Zellzahl abhängt, wurden die Epithelzellen mit verschiedenen *C. albicans* MOIs infiziert. $5 \cdot 10^5$ Epithelzellen wurden wie in 2.2.7.2 und der *C. albicans* Stamm SC5314 wie in 2.2.5 beschrieben kultiviert. Die MOIs reichten von einer MOI = 1 ($5 \cdot 10^5$ Zellen) bis zu einer MOI = 100 ($5 \cdot 10^7$ Zellen). Nach 4, 6 und 8 Stunden wurde die LDH Konzentration im Überstand bestimmt (2.2.8). Als negativ Kontrolle dienten nicht infizierte A431 Zellen (8 h, 0 *Candida*). Aus Abb. 3.3 wird ersichtlich, dass der Infektionsüberstand mit einer MOI = 2 ($1 \cdot 10^6$ Zellen) nach 6 und 8 Stunden Infektionszeit, im Gegensatz zu den Überständen mit höheren Zellzahlen, die höchsten LDH Konzentrationen aufwies.

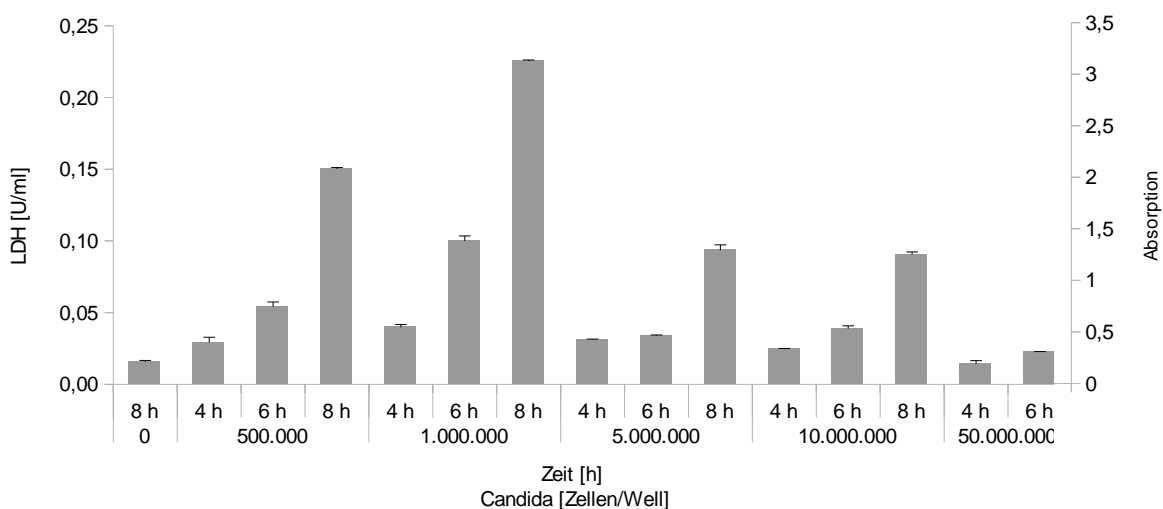


Abb. 3.3: LDH Konzentrationen im Infektionsüberstand mit verschiedenen *C. albicans* Zellzahlen
LDH Konzentrationen im Infektionsüberstand von Epithelzellen, die mit unterschiedlichen *Candida albicans* SC5314 Zellzahlen infiziert wurden. Die Proben wurden nach 4, 6 und 8 Stunden Infektion genommen. 0,1 U/ml entsprachen einer Absorption von 1,218. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 2 Replikaten.

Die LDH Werte der mit $5 \cdot 10^6$ und $1 \cdot 10^7$ Hefezellen infizierten Proben waren vor allem nach 6 und 8 Stunden deutlich niedriger als bei den Proben mit geringerer *C. albicans* Zellzahl.

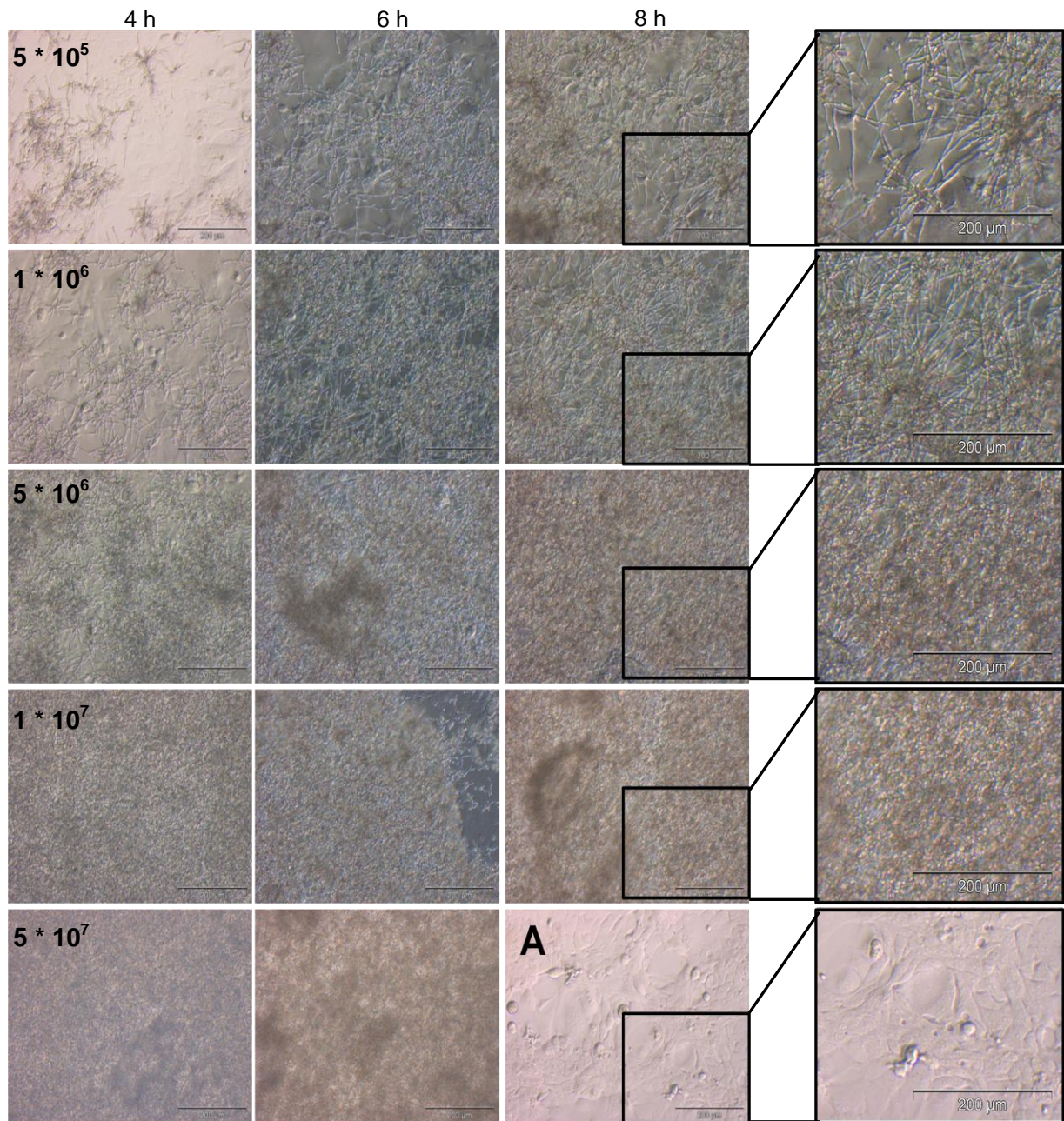


Abb. 3.4: Infektion der Epithelzellen mit verschiedenen *C. albicans* Zellzahlen

Aufnahmen der mit verschiedenen SC5314 Zellzahlen infizierten Epithelzellen im 24-Well-Format.

A: negativ Kontrolle, A431; Balken - 200 µm

Die Bilder befinden sich auf der dieser Arbeit beigefügten DVD.

Abb. 3.4 zeigt Fotos der einzelnen Proben, in denen die Menge an gebildeten Hyphen zu erkennen ist. Auf den Bildern mit den höheren *C. albicans* Zellzahlen (ab $5 \cdot 10^6$ *C. albicans*) ist zu erkennen, dass keine langen Hyphen ausgebildet wurden. Die Hyphenbildung war offensichtlich unterdrückt.

Nach 8 Stunden Infektion mit $5 \cdot 10^5$ Hefezellen waren bereits ~ 80 % der Epithelzellen, und nach 8 Stunden mit $1 \cdot 10^6$ Hefezellen ~ 99 % der Epithelzellen mit *C. albicans* Hyphen

überwachsen. Da bei künftigen Versuchen auch mit Infektionszeiträumen von mehr als 8 Stunden gearbeitet werden sollte, wurde für die weiteren Versuche in 24-Well-Platten eine $\text{MOI} = 1$ gewählt. Zum einen sollte so ein zu schnelles Überwachsen der Epithelzellen verhindert werden und zum anderen verbrauchen zu viele Hefen die im Medium enthaltenen Nährstoffe zu schnell, so dass beobachtete Effekte nicht mehr eindeutig auf die *C. albicans* Infektion, sondern möglicherweise auf eine Nährstofflimitierung zurückzuführen wären.

3.1.3 Differenzieren von HL-60

Neutrophile sollten als Repräsentanten des Immunsystems in den Infektionsmodellen eingesetzt werden. Um nicht nur auf primäre PMN angewiesen zu sein, sollte auch die Zelllinie HL-60 verwendet werden. Bei diesen Zellen handelt es sich um promyeloische Zellen, die zunächst noch zu Neutrophilen differenziert werden müssen. Ein Maß für den Fortschritt der Differenzierung ist die Struktur der Zellkerne. Um deren Veränderung zu erfassen, wurden die HL-60 Zellen wie in 2.2.4 beschrieben mit $1 \mu\text{M}$ Retinsäure oder 1,25 % DMSO versetzt und für 7 Tage im Brutschrank inkubiert. Nach 2, 3, 4 und 7 Tagen wurde jeweils ein Aliquot der Zellen abgenommen, die Lebendzellzahl bestimmt und die Zellkerne mit DAPI angefärbt (2.2.1.1 und 2.2.12.1). Nach 4 Tagen wurde ein Medienwechsel vorgenommen. Durch Auszählen der morphologisch unterschiedlichen Zellkerne der Zellen am Fluoreszenzmikroskop konnten das geeignete Differenzierungsmittel und der geeignete Zeitpunkt für die Zellernte bestimmt werden (Abb.3.5 und Abb. 3.6).

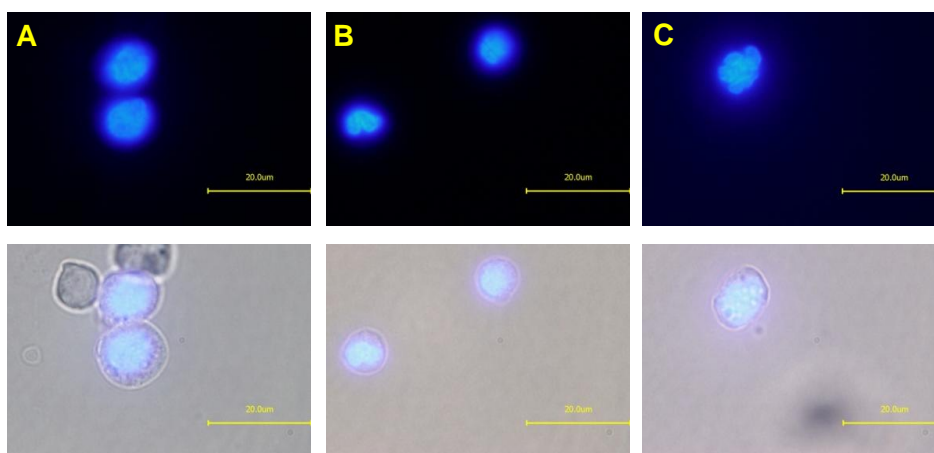


Abb. 3.5: Morphologie der Zellkerne während der Granulopoese der HL-60 Zellen
A: zu Beginn der Granulopoese: die Zellen befinden sich im Stadium der Promyelozyten;
B: Nach 2 Tagen: die Zellen sind zu Metamyelozyten mit „bohnenartigen“ Zellkernen differenziert;
C: Nach 7 Tagen: die Zellen sind zu segmentkernigen Granulozyten ausgereift.

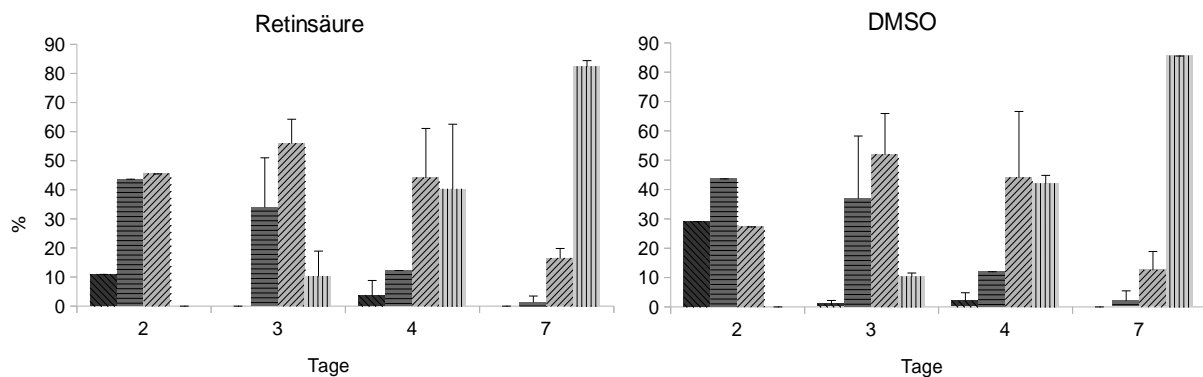


Abb. 3.6: Stadien der Granulopoese der HL-60 Zellen

Die mit DAPI gefärbten Zellkerne wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei (2, 3 und 4 Tage) bzw. drei (7 Tage) biologischen Replikaten.

Nach 7 Tagen waren mehr als 80 % der Zellen zu Granulozyten differenziert und somit am Ende der Granulopoese angelangt. Da allerdings nach 7 Tagen ein Anstieg der Anzahl toter Zellen registriert wurde, wurden die Zellen für die weiteren Versuche nur noch über 6 Tage differenziert.

Die Zellen wurden des Weiteren auf ihre Fähigkeit zur Interleukin 8 Produktion, als Antwort auf eine *C. albicans* Infektion der Epithelzellen, getestet. Hierzu wurden die Zellen wie im Infektionsmodell ohne direkten Kontakt von Epithel- und Immunzellen in Zellkultureinsätzen (2.2.7.1) beschrieben kultiviert. $1 \cdot 10^5$ A431 Zellen wurden mit $1 \cdot 10^5$ SC5314 infiziert. Nach 12 Stunden Infektion wurden die für 6 Tage mit Retinsäure oder DMSO differenzierten HL-60 Zellen zugegeben und für weitere 12 Stunden inkubiert. Als Kontrolle wurden *C. albicans* infizierte A431 ohne Zugabe von HL-60 Zellen verwendet. Außerdem wurde die IL-8 Ausschüttung von nicht differenzierten HL-60 Zellen getestet.

Die Messung der IL-8 Konzentrationen erfolgte im Zellkulturüberstand der 6-Well-Platten. Die mit Retinsäure differenzierten Zellen zeigten, im Gegensatz zu den mit DMSO differenzierten, eine deutlich vermehrte IL-8 Ausschüttung (Abb. 3.7). Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit mit Retinsäure als Differenzierungsmittel gearbeitet. Auch die nicht differenzierten HL-60 Zellen zeigten eine leicht erhöhte IL-8 Sekretion, jedoch weitaus weniger als die differenzierten Zellen.

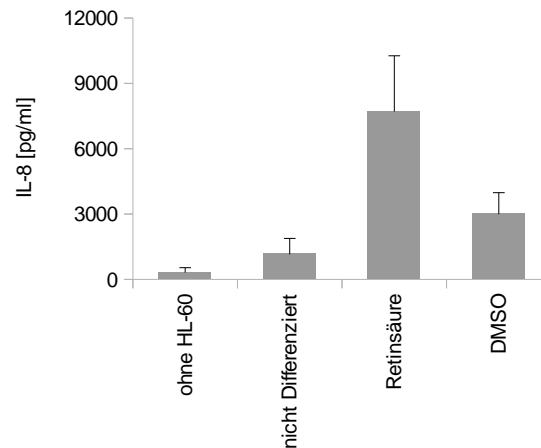


Abb. 3.7: Interleukin 8 Ausschüttung bei verschiedenen Differenzierungsmitteln

Die Messung erfolgte in Proben aus dem Infektionsmodell mit Zellkultureinsätzen. Es wurden in Zellkultureinsätzen A431 Zellen mit SC5314 infiziert und auf die äußere Seite der Membran HL-60 Zellen gegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen biologischen Replikaten.

3.2 Infektionsmodell ohne direkten Kontakt von Epithelzellen und Neutrophilen

Die Versuche ohne direkten Kontakt zwischen den mit *Candida albicans* infizierten A431 Epithelzellen und den humanen Neutrophilen fanden in ThinCert™ Zellkultureinsätzen statt (2.2.7.1). Die Kommunikation der Immunzellen mit den Epithelzellen konnte also nur über ins Medium sekretierte Signalproteine erfolgen.

Zunächst wurde die LDH-Konzentration in den Zellkulturüberständen von *Candida albicans* infizierten Epithelzellen mit und ohne Immunzellen untersucht. Die Epithelzellen wurden mit $1 \cdot 10^5$ SC5314 infiziert. Nach 12 Stunden Infektion wurden die frisch isolierten PMNs (2.2.6) oder die für 6 Tage mit Retinsäure differenzierten HL-60 Zellen (2.2.4) auf die den Epithelzellen abgewandte Seite der Membran des Inserts gegeben. Es wurden die LDH Ausschüttung als Maß für die Zellschädigung und die Konzentration des Zytokins Interleukin 8 bestimmt. In den Proben, in denen PMNs kultiviert wurden, wurden zusätzlich noch die Konzentrationen der Zytokine IL-1 α und TNF- α ermittelt. Als Kontrolle dienten nicht

infizierte A431 Zellen, sowie *C. albicans* ohne Epithelzellen. Des Weiteren wurden die Epithelzellen jeweils nur mit PMNs oder HL-60, ohne *C. albicans*, und *C. albicans* nur mit den Immunzellen, ohne Epithelzellen (nur für die IL-8 Bestimmung), kultiviert.

3.2.1 Epithelzellschädigung durch *C. albicans*

Wie in Abb. 3.8 zu sehen, konnte nur in Proben, bei denen auch *C. albicans* anwesend war, LDH-Aktivität im Überstand nachgewiesen werden. Allerdings unterlagen die Messwerte sehr großen Schwankungen.

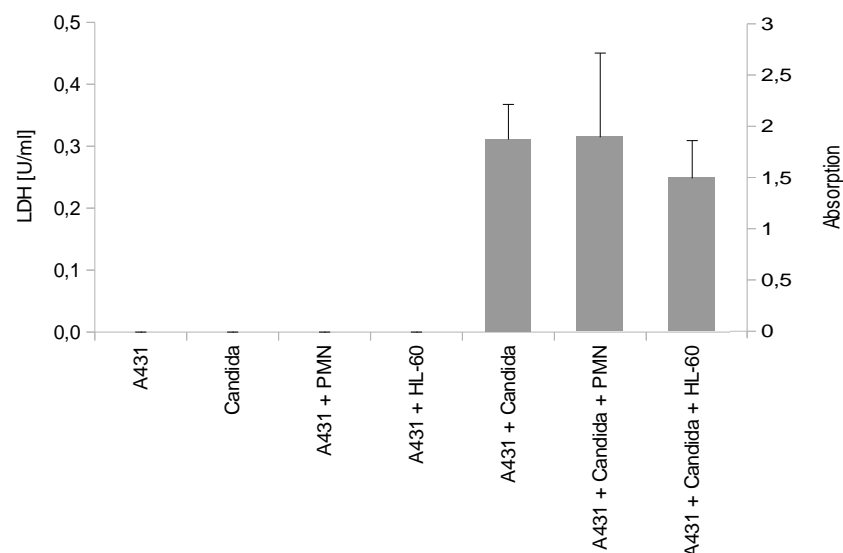


Abb. 3.8: LDH Ausschüttung im Infektionsmodell mit Zellkultureinsätzen

Gemessen wurde die LDH Konzentration nach 12 Stunden Vorinfektion mit SC5314 plus weitere 12 Stunden in Anwesenheit der Immunzellen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen biologischen Replikaten.

Die Proben ohne *C. albicans* (A431, A431 + PMN, A431 + HL-60) zeigten keine Freisetzung von LDH. Die Schädigung und die dadurch freigesetzte LDH beruhten also nur auf der Infektion mit *C. albicans* (A431 + *Candida*, A431 + *Candida* + PMN, A431 + *Candida* + HL-60). Hierbei konnte jedoch keine signifikante Schutzwirkung durch die Immunzellen beobachtet werden, da kein Unterschied im Ausmaß der Zellschädigung zwischen den Proben mit PMNs oder HL-60 und ohne sichtbar war.

3.2.2 Zytokin-Nachweis

Die Messung der Zytokine wurde wie in 2.2.9 beschrieben durchgeführt. Die Konzentrationen des sekretierten IL-8 wurden zur besseren Übersichtlichkeit in Abb. 3.9 in zwei verschiedenen Grafiken dargestellt, da die IL-8 Konzentrationen in den Überständen, in denen HL-60 Zellen kultiviert wurden, etwa 5 mal so hoch waren wie in denen aus Untersuchungen mit PMNs oder ohne Immunzellen.

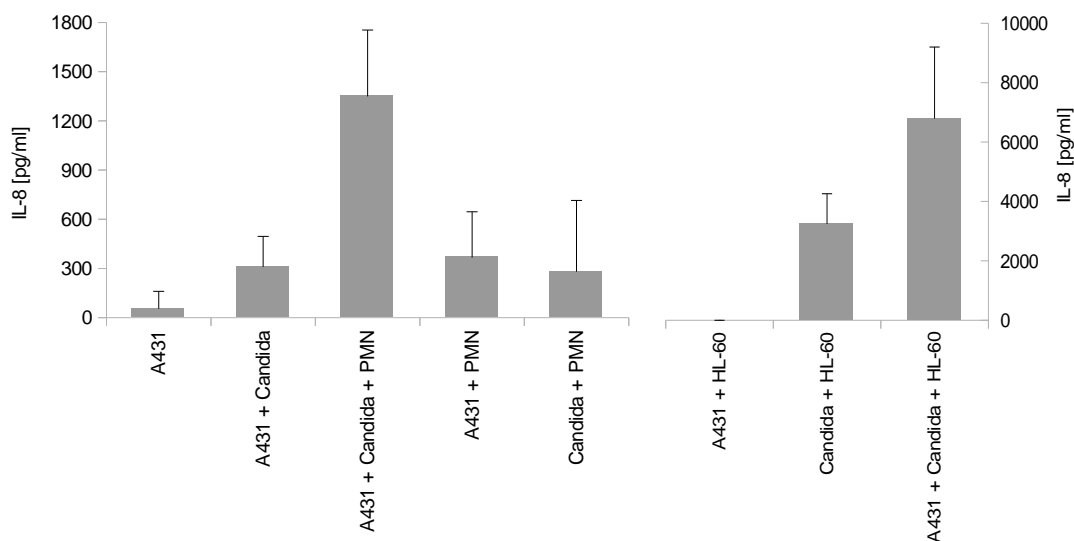


Abb. 3.9: IL-8 Sekretion im Infektionsmodell mit Zellkultureinsätzen

Gemessen wurde die IL-8 Konzentration nach 12 Stunden Vorinfektion mit SC5314 plus weiterer 12 Stunden in Anwesenheit der Immunzellen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 4 unabhängigen biologischen Replikaten.

Nach Zugabe der Immunzellen ist ein deutlicher Anstieg der IL-8 Konzentrationen zu erkennen. Die A431 Zellen alleine sekretierten IL-8. Die Menge an IL-8 bei der Infektion mit *C. albicans* war ungefähr doppelt so hoch. Auch in den Überständen der Kultivierung von Epithelzellen mit PMNs oder HL-60 Zellen und denen mit *C. albicans* und den Immunzellen alleine wurde IL-8 nachgewiesen, jedoch deutlich weniger als in den Überständen aller drei Zelltypen zusammen.

Keines der Zytokine IL-1 α und TNF- α konnte in den Überständen (A431, A431 + *Candida*, A431 + PMN und A431 + *Candida* + PMN) detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

3.3 Infektionsmodell mit direktem Kontakt von Epithelzellen und Neutrophilen

Die Epithelzellen wurden, wenn nicht anders beschrieben, für alle Versuche wie in 2.2.7.2 erläutert ausgesät und kultiviert. Die Zahl der Epithelzellen wurde mit $5 \cdot 10^5$ Zellen/Well so gewählt, dass am Versuchstag die Zellen einen komplett dichten Zellmonolayer bildeten. Alle Versuche wurden mit dem *C. albicans* Stamm SC5314 nach 2.2.5 durchgeführt. Die HL-60 Zellen und die PMNs wurden immer wie in 2.2.4 und 2.2.6 erläutert differenziert, bzw. isoliert.

3.3.1 Kontinuierliche Aufnahmen der Infektion mit direktem Epithel- und Immunzellen Kontakt

Die Fotos aus denen die Filme erstellt wurden, wurden mit dem Biozero BZ-8100 Mikroskop von Olympus aufgenommen. Die Fotos und die Filme sind auf der beigefügten DVD gespeichert.

Die Zellen wurden wie in 2.2.7.2 beschrieben in Cellview™ Zellkulturschalen mit 4 Kompartimenten kultiviert. $1 \cdot 10^5$ A431 wurden wie in 2.2.12 ausgesät und mit $1 \cdot 10^5$ *C. albicans* infiziert. Anschließend wurden die Schalen in die zum Mikroskop gehörende Inkubationskammer gestellt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Der Film 1 „SC5314 infizierte A431“ zeigt die Infektion der Epithelzellen über einen Zeitraum von 12 Stunden. Dabei wurde alle 3 Minuten ein Bild aufgenommen und zu einem Film zusammengefügt. In Abb. 3.10 sind Ausschnitte aus dem Film dargestellt. Auf dem Bild nach 0 h Infektionszeit sind die Epithelzellen am Boden der Zellkulturschale und die *C. albicans* Hefen (gelber Kreis) zu erkennen. Nach 5 Stunden waren bereits 30 % der Epithelzellen mit Hyphen überwachsen und nach 10 Stunden waren es ca. 50 %. In dem Film ist allerdings auch gut zu sehen, dass sich die Epithelzellen weiterhin teilten und nicht vom Boden ablösten, was auf ein Sterben der Zellen hingedeutet hätte. Die Epithelzellen wurden also von *C. albicans* überwachsen, jedoch nicht abgetötet.

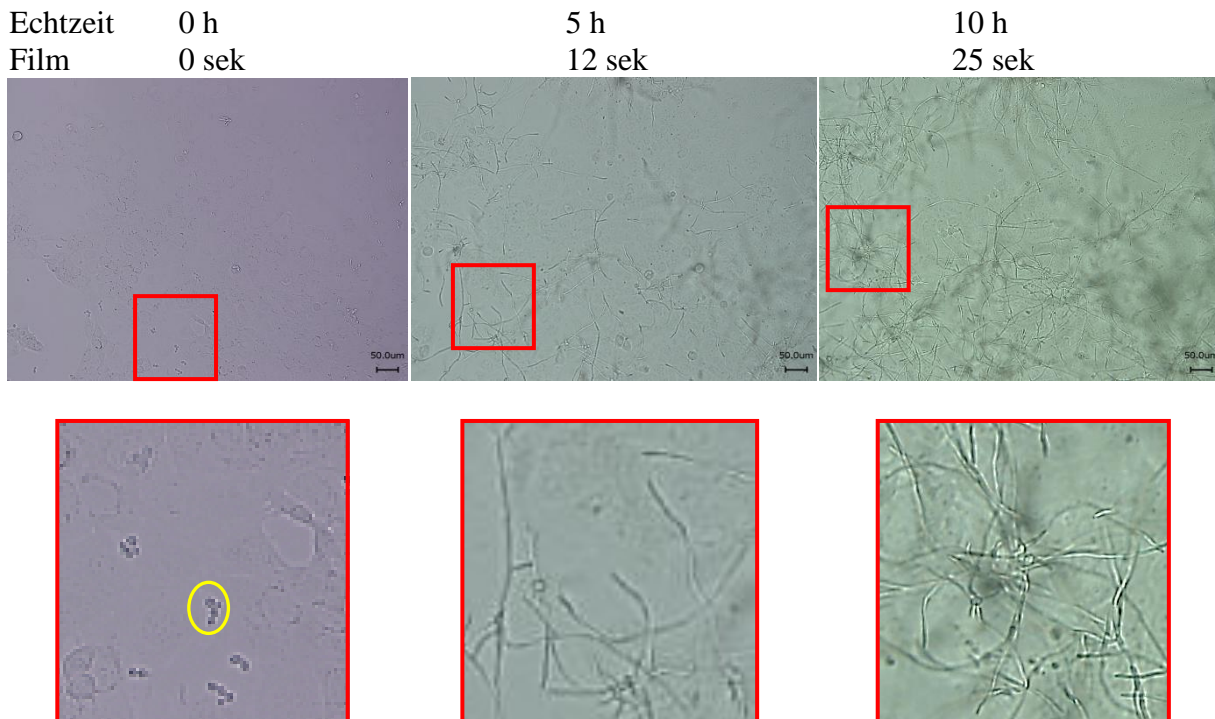


Abb. 3.10: Ausschnitte aus dem Film: „SC5314 infizierte A431 Zellen“

5×10^5 Epithelzellen wurden mit 1×10^5 *C. albicans* infiziert. Alle 5 Minuten wurde ein Bild aufgenommen. Die Gesamtlänge des Films in Echtzeit beträgt 10 Stunden.

Die rot umrandeten Bilder in der unteren Reihe stellen Vergrößerungen des rot markierten Bereichs der oberen Bilder dar. Die gelbe Umrandung markiert *C. albicans* Hefezellen.

Balken - 50 μ m

Für die Filme „SC5314 infizierte A431 Zellen mit primären humanen Neutrophilen“ wurden die Epithelzellen mit 1×10^5 SC5314 infiziert. Zeitgleich mit den Hefezellen wurden 5×10^5 PMNs (2.2.6) zu den Epithelzellen gegeben. Von den Zellen wurde über einen Zeitraum von 10 Stunden jede Minute ein Bild aufgenommen. Das Bildbearbeitungsprogramm mit dem die Fotos zu den Filmen zusammengefügt wurden, konnte maximal 300 Bilder zu einem Film verarbeiten. 300 Bilder entsprechen hierbei einer Infektionszeit von 5 Stunden. Also mussten die 10 Stunden Bildmaterial, die von der Infektion aufgenommen wurden, in zwei Filme aufgeteilt werden. Der Film 2.1 „SC5314 infizierte A431 Zellen mit primären humanen Neutrophilen_erster Film“ zeigt den Zeitraum von 0 h bis 5 h Infektion und der Film 2.2 „SC5314 infizierte A431 Zellen mit primären humanen Neutrophilen_zweiter Film“ den Zeitraum 5 h - 10 h.

In dem ersten Film 2.1 ist zu erkennen, dass die Hyphen, die von einer Hefezelle ausgebildet wurden, von den Neutrophilen phagozytiert wurden. Die Hefen und Hyphen wurden von den Neutrophilen umschlossen und dadurch von den Epithelzellen ferngehalten. Auch nach 5

Stunden Inkubationszeit waren keine adhärenen Hyphen auf den Epithelzellen zu erkennen (Abb. 3.11).

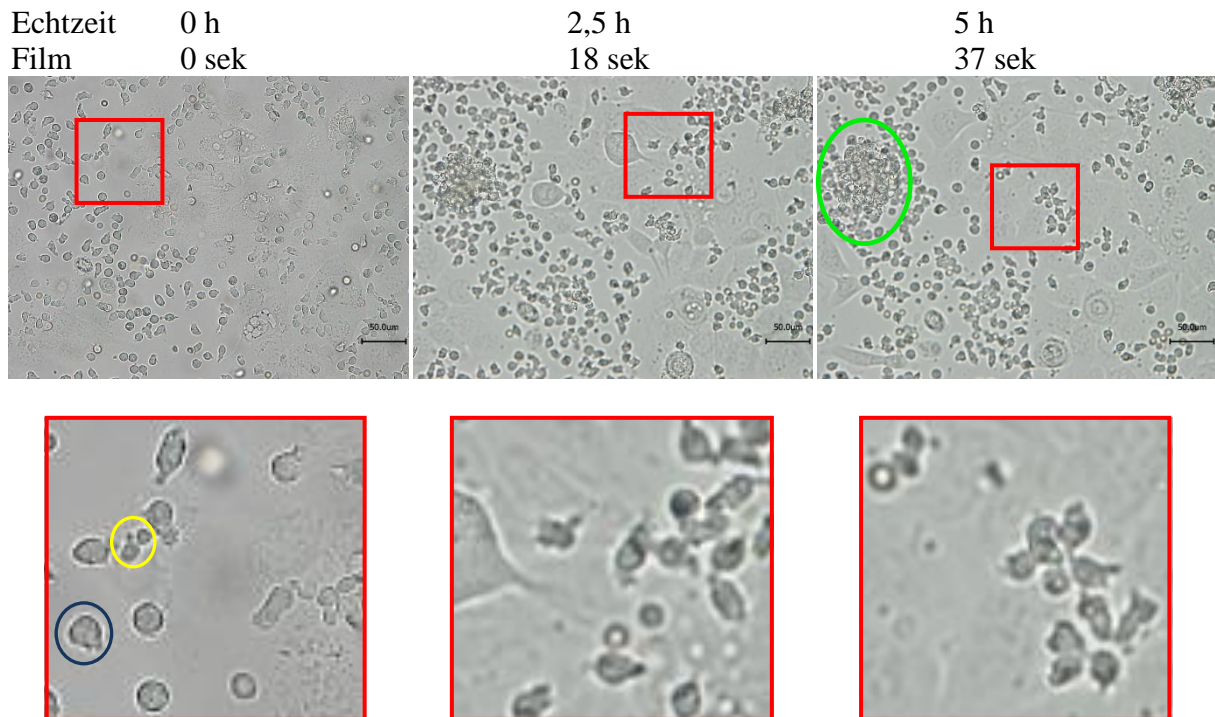


Abb. 3.11: Ausschnitte aus dem Film 2.1: „SC5314 infizierte A431 Zellen mit primären humanen Neutrophilen“

$5 \cdot 10^5$ Epithelzellen wurden mit $1 \cdot 10^5$ *C. albicans* infiziert und zeitgleich $1 \cdot 10^6$ PMNs zugeben. Jede Minute wurde ein Bild aufgenommen. Die Gesamtlänge des Films in Echtzeit beträgt 5 Stunden.

Die rot umrandeten Bilder in der unteren Reihe stellen Vergrößerungen des rot markierten Bereichs der oberen Bilder dar. Die gelbe Umrandung markiert 2 *Candida* Hefezellen und die blaue Umrandung einen Neutrophilen. Die grüne Umrandung markiert von Neutrophilen eingeschlossene *Candida albicans* Hyphen. Balken - 50 µm

Der zweite Film 2.2 dieser Infektion zeigt wie nach 8 Stunden Infektion *C. albicans* Hyphen aus der Ansammlung von Neutrophilen ausbrachen. Die Hyphen wurden zwar sofort wieder von weiteren Neutrophilen phagozytiert, die Hyphen waren jedoch in der Lage weiterzuwachsen (Abb. 3.12). Die Schutzwirkung der Neutrophile hatte also nachgelassen. Dies lag entweder daran, dass nicht mehr ausreichend Neutrophile zur Verfügung standen, um die Hyphen am Wachstum zu hindern, oder die Neutrophile waren nicht mehr so vital, aufgrund der fortgeschrittenen *in vitro* Inkubation.

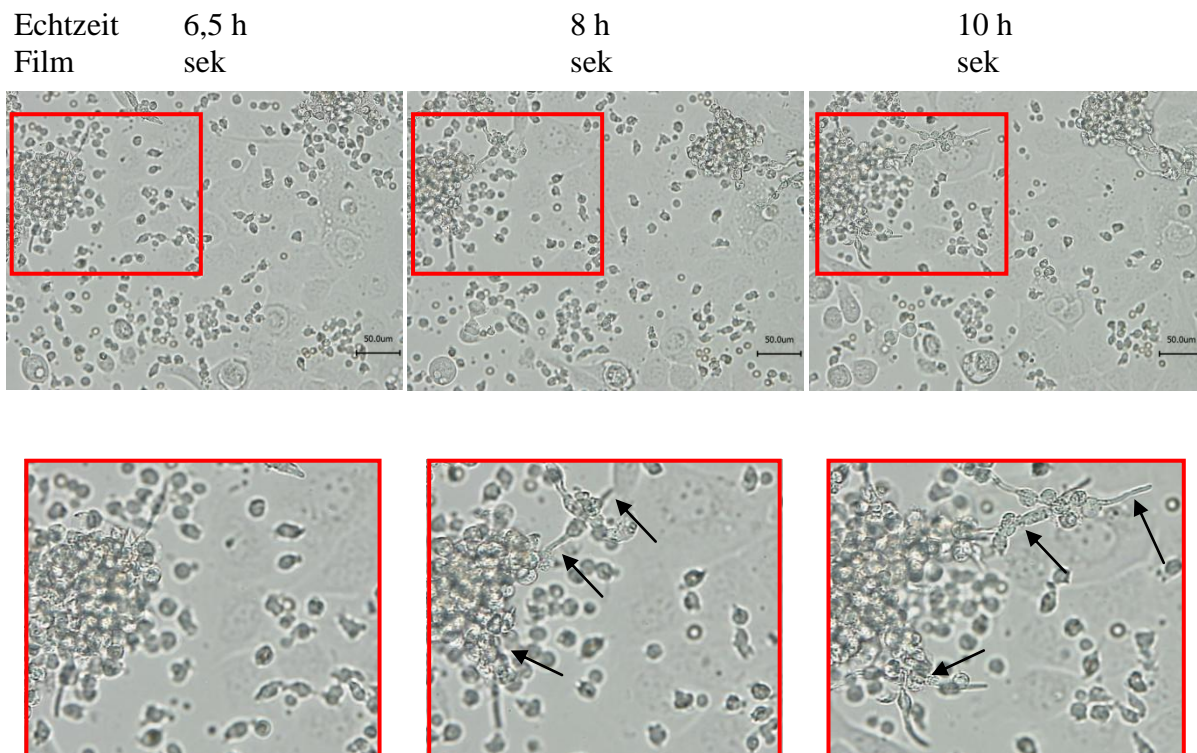


Abb. 3.12: Ausschnitte aus dem Film 2.2: „SC5314 infizierte A431 Zellen mit primären humanen Neutrophilen_weiter Film“

Der zweite Film der Infektion zeigt den Zeitraum 5 h - 10 h. Jede Minute wurde ein Bild aufgenommen. Die Gesamtlänge des Films in Echtzeit beträgt 5 Stunden.

Die rot umrandeten Bilder in der unteren Reihe stellen Vergrößerungen des rot markierten Bereichs der oberen Bilder dar. Die Pfeile zeigen an, wo Hyphen aus den Neutrophilen ausbrechen.

Balken - 50 µm

In Abb. 3.13 ist ein Ausschnitt aus dem Film 2.1 „SC5314 infizierte A431 Zellen mit primären humanen Neutrophilen_erster Film“ nach 55 Minuten Infektion (7 Sekunden im Film) vergrößert dargestellt. Hier ist deutlich die Phagozytose durch die Neutrophilen zu sehen. Bild B ist eine Vergrößerung des rot umrandeten Ausschnitts aus Bild A. Die Bilder C - E sind Folgebilder im zeitlichen Abstand von einer Minute in der gleichen Vergrößerung wie Bild B. Es sind zwei *C. albicans* Zellen zu sehen, die gerade angefangen haben Hyphen auszubilden (Bild B). In Bild C nähert sich ein Neutrophil der oberen Zelle und phagozytiert sie in Bild D von der Hyphe aus. In Bild E hat der Neutrophil beide Hefezellen aufgenommen. Da ein Neutrophil nicht die gesamte Hyphe aufnehmen konnte, wurden diese Hyphen im weiteren Verlauf des Films noch von weiteren Neutrophilen aufgenommen, so dass sich ein Zellklumpen gebildet hatte, der *C. albicans* von den Epithelzellen fernhielt (Abb. 3.11 grüne Umrandung).

Echtzeit 55 min
Film 7 sek

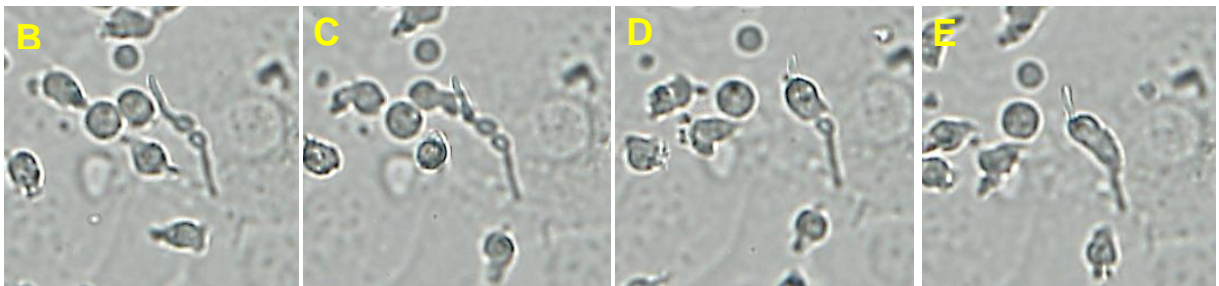
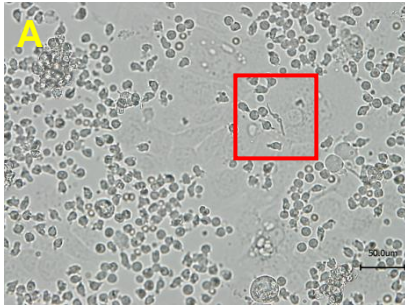


Abb. 3.13: Phagozytose von *Candida albicans* durch Neutrophile

Die Ausschnitte stammen aus dem Film 2.1 „SC5314 infizierte A431 Zellen mit primären humanen Neutrophilen_erster Film“. Die Bilder B - E sind Vergrößerungen der roten Umrandung in Bild A.

Balken - 50 µm

3.3.2 LDH Messungen in verschiedenen Medien mit und ohne FBS

Anhand von ungewöhnlich hohen Absorptionswerten bei der Probenanalytik mit dem LDH Assay während dieser Arbeit hat sich herausgestellt, dass das Zellkulturmedium und auch das Vorhandensein von FBS einen Einfluss auf die LDH Messung hatten. Deshalb wurde getestet, wie stark diese Effekte das Ergebnis der Messung beeinflussten.

Dazu wurden die Blindwerte von DMEM-, RPMI- und RPMI⁺-Medium mit dem LDH-Zytotoxizitätsassay (2.2.8) bestimmt.

In Tab. 3.1 sind die Ergebnisse der Messung dargestellt. Es zeigte sich, dass die Zugabe von FBS einen deutlichen Anstieg der Absorption bewirkte. Dies hatte zur Folge, dass die LDH Konzentration nur in FBS freien Medien bestimmt werden konnte. Bei der Verwendung von PMNs musste dem Medium aber FBS zugesetzt werden. Somit konnte in diesen Proben keine LDH Bestimmung durchgeführt werden. Zwischen der Verwendung von DMEM und RPMI als Zellkulturmedium konnte jedoch kein großer Unterschied in den Absorptionen festgestellt werden.

Tab. 3.1: Einfluss von verschiedenen Medien und dem Zusatz von FBS auf die LDH-Messung

Es wurden die Absorptionen der Medien mittels LDH-Zytotoxizitätsassay bestimmt.

Medium	DMEM	RPMI	RPMI ⁺
Absorption	0,143	0,112	1,606

Die LDH-Konzentrationen der Proben aus dem Infektionsmodell ohne direkten Kontakt von Epithel- und Immunzellen (3.2) konnte jedoch bestimmt werden, da das Medium, das in der 6-Well-Platte vorgelegt wurde, FBS frei war (2.2.7.1). Nur das Medium, das auf die umgedrehten Zellkultureinsätze gegeben wurde und mit dem die PMNs versorgt wurden, enthielt 10 % FBS. Es gelangte aber nicht genug FBS in das Medium in der 6-Well-Platte um den LDH Assay zu beeinflussen. Dies ist daran zu erkennen, dass in Abb. 3.8 keine LDH in der Kontrolle A431 gemessen wurde.

3.3.3 Lebend/Tot-Färbung

Mit Hilfe der Lebend/Tot-Färbung sollte das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen ermittelt werden. So konnte das Maß der durch die *Candida albicans* Infektion abgetöteten Zellen ermittelt werden. $3 \cdot 10^5$ A431 Zellen wurden wie in 2.2.12 kultiviert und am nächsten Tag für 1 Stunde mit $3 \cdot 10^5$ *C. albicans* infiziert. Anschließend wurden $3 \cdot 10^6$ PMNs (2.2.6) zugegeben und die Schalen mit den Zellen für weitere 6,5 Stunden inkubiert. Die Proben, die weitere 18 Stunden inkubiert werden sollten, wurden mit nur $5 \cdot 10^4$ Hefezellen infiziert. Eine Infektion von 18 Stunden Dauer mit höheren *C. albicans* Zellzahlen führte zu einem Ablösen der Epithelzellen während des Färbeprozesses. Es musste also auf eine geringere MOI zurückgegriffen werden, um Färbungen von den Zellen durchführen zu können. Die Lebend/Tot-Färbung wurde nach 2.2.12.2 und die *C. albicans* Färbung nach 2.2.12.4 durchgeführt. Bei der Aufnahme der Bilder (Abb. 3.14 und Abb. 3.15) wurden verschiedene Fluoreszenzfilter verwendet, so dass unterschiedliche Zelltypen dargestellt werden können. Die Bilder der Färbungen sind auf der beigefügten DVD gespeichert.

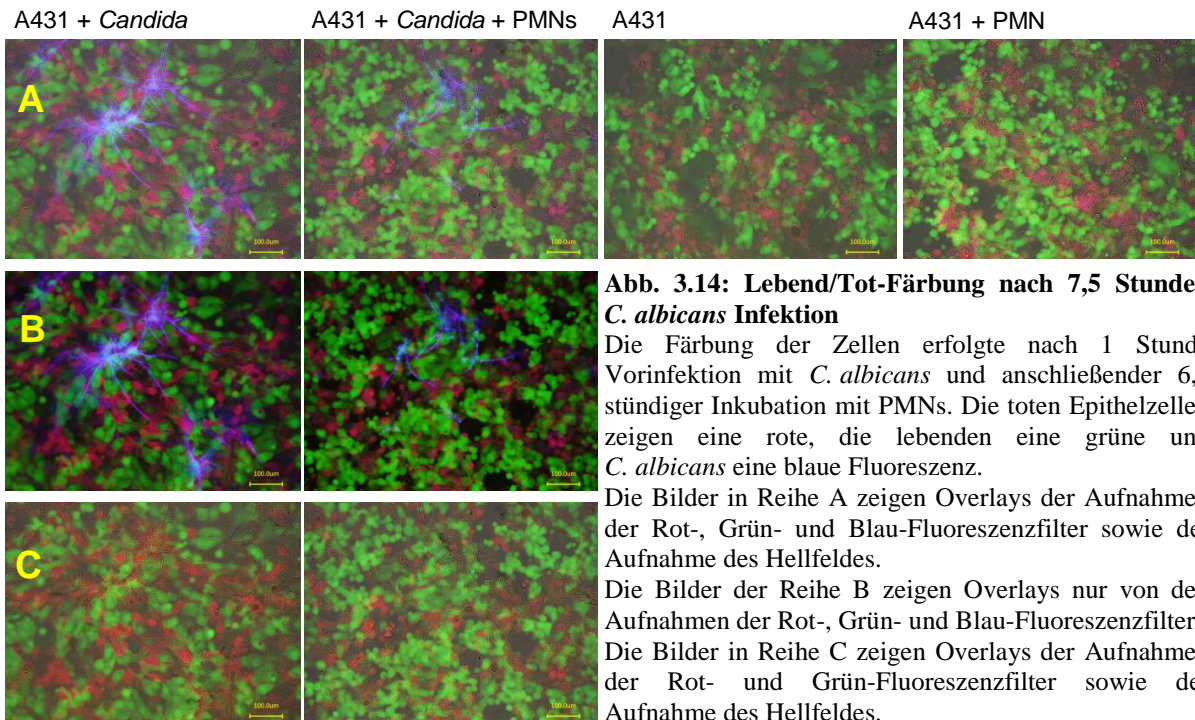


Abb. 3.14: Lebend/Tot-Färbung nach 7,5 Stunden *C. albicans* Infektion

Die Färbung der Zellen erfolgte nach 1 Stunde Vorinfektion mit *C. albicans* und anschließender 6,5 stündiger Inkubation mit PMNs. Die toten Epithelzellen zeigen eine rote, die lebenden eine grüne und *C. albicans* eine blaue Fluoreszenz.

Die Bilder in Reihe A zeigen Overlays der Aufnahmen der Rot-, Grün- und Blau-Fluoreszenzfilter sowie der Aufnahme des Hellfeldes.

Die Bilder der Reihe B zeigen Overlays nur von den Aufnahmen der Rot-, Grün- und Blau-Fluoreszenzfilter.

Die Bilder in Reihe C zeigen Overlays der Aufnahmen der Rot- und Grün-Fluoreszenzfilter sowie der Aufnahme des Hellfeldes.

Anhand der Bilder in Abb. 3.14 ist zu erkennen, dass etwa 10 % mehr Epithelzellen durch die *C. albicans* Infektion getötet wurden als in den nicht infizierten Proben. Der Unterschied war allerdings nicht sehr groß, da auch hier tote Epithelzellen vorhanden waren. Die Zellen, die direkt unter den *C. albicans* Hyphen lagen, wurden jedoch nicht durch den Pilz getötet (Vergleich Reihe B und C). Die Zugabe der Neutrophilen schien eine Schutzwirkung auf die Epithelzellen bewirkt zu haben. Die Neutrophile phagozytieren *C. albicans*, so dass insgesamt weniger *C. albicans* Zellen an der Infektion beteiligt waren als bei den Infektionen ohne Immunzellen.

In Abb. 3.15 sind die Aufnahmen der Zellen nach 18 Stunden Infektion gezeigt. Da hier relativ viele Hyphen gebildet wurden, sind in Reihe C Overlays des Hellfeldes und des Blau-Fluoreszenzfilters dargestellt. Dadurch lassen sich die Hyphen besser erkennen.

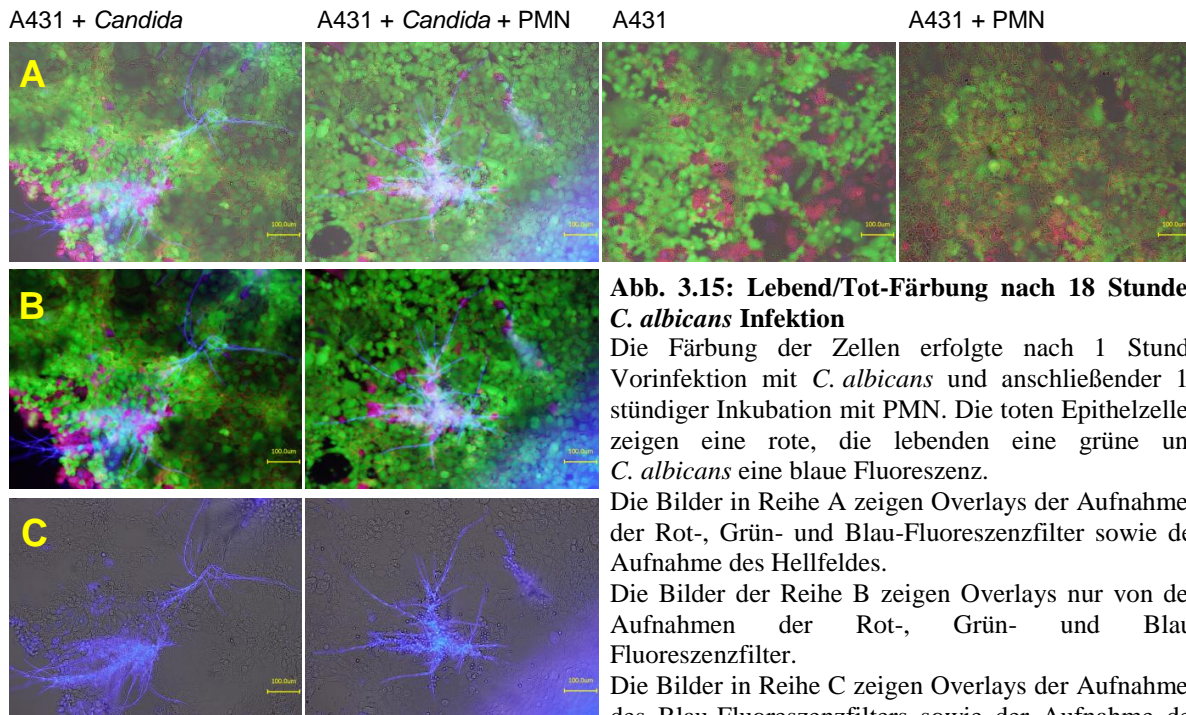


Abb. 3.15: Lebend/Tot-Färbung nach 18 Stunden *C. albicans* Infektion

Die Färbung der Zellen erfolgte nach 1 Stunde Vorinfektion mit *C. albicans* und anschließender 17 stündiger Inkubation mit PMN. Die toten Epithelzellen zeigen eine rote, die lebenden eine grüne und *C. albicans* eine blaue Fluoreszenz.

Die Bilder in Reihe A zeigen Overlays der Aufnahmen der Rot-, Grün- und Blau-Fluoreszenzfilter sowie der Aufnahme des Hellfeldes.

Die Bilder der Reihe B zeigen Overlays nur von den Aufnahmen der Rot-, Grün- und Blau-Fluoreszenzfilter.

Die Bilder in Reihe C zeigen Overlays der Aufnahmen des Blau-Fluoreszenzfilters sowie der Aufnahme des Hellfeldes.

Nach 18 Stunden Infektion (Abb. 3.15) waren die Epithelzellen auch noch weitestgehend vital. Es konnte nur ein leicht verstärktes Absterben der Epithelzellen festgestellt werden. Allerdings lösten sich diese Zellen beim Färben sehr leicht vom Untergrund ab. Die Epithelzellen könnten durch *C. albicans* beeinflusst worden sein, so dass sie nicht mehr an dem Untergrund adhärieren konnten. Wodurch dieser Effekt genau ausgelöst wurde, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden.

3.3.4 Einfluss von Eisenionen auf die Infektion

Da die Verfügbarkeit von Eisenionen einen wichtigen Faktor für die Adhärenz der Hefe darstellt [Almeida *et al.*, 2009], wurde die Zellschädigung von Epithelzellen durch eine Infektion mit *C. albicans* bei verschiedenen Eisenionen Konzentrationen bestimmt. Getestet werden sollten die in Tab. 3.2 aufgeführten Medien mit unterschiedlichen Fe^{3+} Konzentrationen. Die Fe^{3+} Ionen wurden durch die Zugabe von 50 μM FeCl_3 in das Medium gebracht.

Tab. 3.2: Fe^{3+} Ionen Konzentration der verwendeten Medien

Medium	Fe^{3+} - Gehalt [μM]
RPMI	0
RPMI + Fe^{3+}	50
DMEM	0,248

$3 \cdot 10^5$ A431 Zellen/Well wurden über Nacht bei 37°C und 5 % CO_2 in RPMI⁺-Medium inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und 1 ml von dem jeweiligen zu testenden Medium zugegeben. Zeitgleich mit dem Medienwechsel erfolge die Infektion mit $3 \cdot 10^5$ *C. albicans* pro Well. Nach 16 Stunden wurden die Überstände von den Zellen abgenommen, zentrifugiert (2.2.7.2) und die LDH-Konzentration wie in 2.2.8 beschrieben bestimmt.

Die Ergebnisse der LDH-Messung sind in Abb. 3.16 dargestellt. Da bei dieser Analyse verschiedene Medien verwendet wurden, wurde keine Standardkurve aufgenommen. Stattdessen wurden die gemessenen Absorptionen aufgetragen, so dass nur eine vergleichende Aussage getroffen werden kann und keine absoluten Werte ermittelt werden konnten.

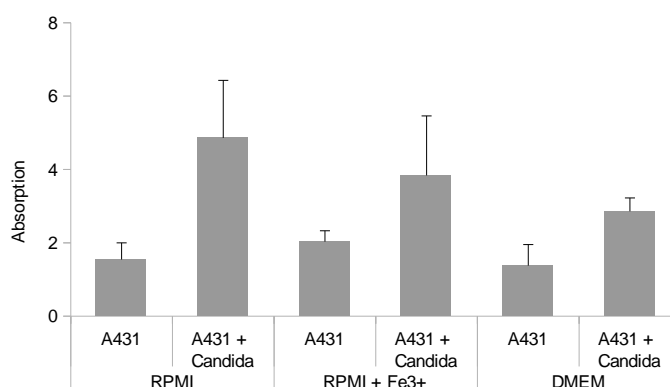


Abb. 3.16: LDH Gehalt nach einer *C. albicans* Infektion bei verschiedenen Fe^{3+} -Ionen Konzentrationen

Gemessen wurden die Absorptionen während der LDH-Bestimmung nach einer Infektion in verschiedenen Medien mit unterschiedlicher Eisenionen Konzentration. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 biologisch unabhängigen Replikaten.

Anhand der Abb. 3.16 ist zu erkennen, dass der Gehalt von Eisenionen keinen verstärkenden Einfluss auf die Zerstörung der Epithelzellen durch *Candida albicans* hatte. Es lies sich sogar eine leichte Verringerung der LDH Menge in den Proben mit Eisenionen erkennen.

Der Vergleich der hier ermittelten Werte mit denen aus Abb. 3.1 zeigt, dass die ermittelten Absorptionen für die Proben A431 + SC5314 in RPMI- und DMEM-Medium weitestgehend übereinstimmten.

3.3.5 Glukosebestimmung im Infektionsüberstand mittels HPLC

Einige Effekte die während einer Infektion der Epithelzellen mit *Candida albicans* beobachtet wurden, könnten möglicherweise auf eine Nährstofflimitierung zurückgeführt werden. Aus diesem Grund wurde der Glukoseverbrauch während einer Infektion ermittelt. $5 \cdot 10^5$ Epithelzellen wurden mit *C. albicans* (MOI = 1) für 4 Stunden infiziert. Nach diesen 4 Stunden wurden die Immunzellen ($5 \cdot 10^6$ PMN oder $2,8 \cdot 10^6$ HL-60) zugegeben und für weitere 6, 12, 16 und 21 Stunden inkubiert. Nach 10 Stunden waren die Epithelzellen also für 4 Stunden mit *C. albicans* vorinkubiert und für weitere 6 Stunden mit den Immunzellen inkubiert worden. Nach diesen Zeitpunkten wurden die Überstände abgenommen und im Überstand enthaltene Zellen und andere Schwebstoffe mit Spritzenfiltern abgetrennt. Die Proben wurden auf ihre Glukosekonzentrationen analysiert.

Die Proben ohne A431 Zellen (Caa + PMN und Caa + HL-60) wurden analog zu den Anderen behandelt. Auch hier wurde *C. albicans* für 4 Stunden in den Wells inkubiert, bevor die Immunzellen zugegeben wurden.

In Abb. 3.17 sind die Ergebnisse der Glukosemessung dargestellt. Nach 18 Stunden Infektionszeit war in den Proben in denen *C. albicans* enthalten war, keine Glukose mehr vorhanden. Allerdings wurde in den ersten 10 Stunden der Infektion kaum Glukose verbraucht. Womöglich befanden sich die Hefezellen, durch das Waschen und den Medienwechsel kurz vor der Infektion, in der Lag-Phase. In den folgenden 8 Stunden war ein sehr hoher Glukoseumsatz zu verzeichnen. Die Hefe hatte einen sehr hohen Stoffwechsel und somit einen hohen Energiebedarf, so dass viel Glukose benötigt wurde. Die humanen Zellen hatten einen weitaus geringeren Stoffwechsel und Energiebedarf. Dies lies sich an dem geringen Glukoseverbrauch erkennen. Die Proben, in denen nur menschliche Zellen und keine Hefe enthalten waren, enthielten auch nach 25 Stunden ausreichend Glukose. Wahrscheinlich hatten die PMNs die Hefen phagozytiert und dadurch den Stoffwechsel gebremst. Allerdings wurden die Hefen nicht von den PMNs getötet, sondern nur kurzzeitig aufgehalten. Vermutlich

ist der Pilz nach etwa 14 Stunden (Zeitwert 18 Stunden, jedoch nur 14 Stunden mit den Immunzellen) wieder aus den PMNs ausgebrochen und hat wieder begonnen zu wachsen und Hyphen zu bilden. Hierzu passten auch die bei dem Film 2.2 beobachteten Effekte (Abb. 3.17). Warum dieser Effekt nicht bei den A431 + Candida + PMN zu beobachten war, kann nicht eindeutig erklärt werden. Möglicherweise waren die Hyphen auf den Epithelzellen fester adhäriert als auf der Plastikoberfläche der Wells, so dass die Hyphen nicht von den Neutrophilen phagozytiert werden konnten.

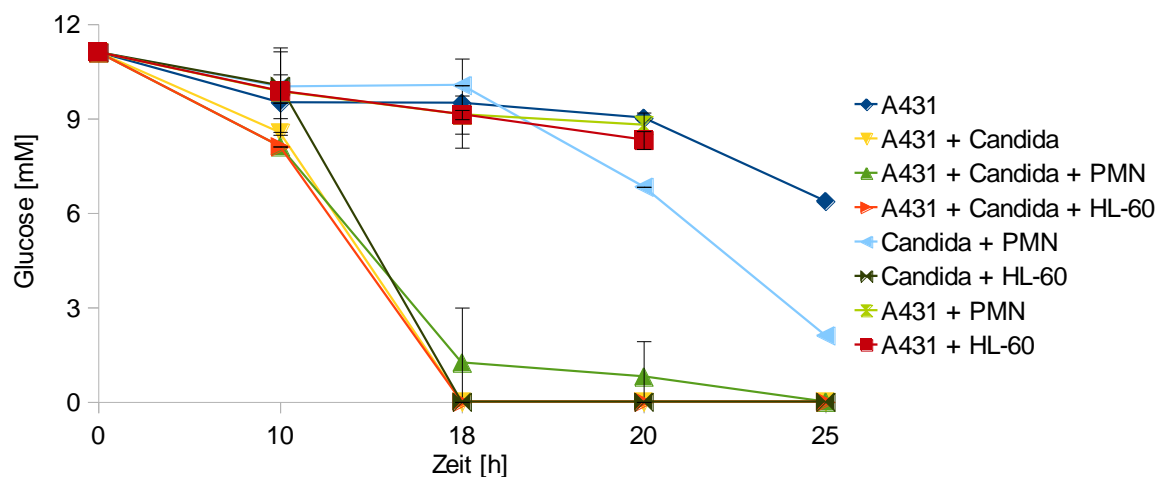


Abb. 3.17: Glukoseverbrauch während einer Infektion der Epithelzellen mit *C. albicans* und Immunzellen

$5 \cdot 10^5$ Epithelzellen wurden zunächst 4 Stunden mit $5 \cdot 10^5$ *C. albicans* Vorinfiziert. Anschließend wurden die Immunzellen ($5 \cdot 10^6$ PMN und $2,8 \cdot 10^6$ HL-60) zugegeben und für weitere 6, 12, 16 und 21 Stunden inkubiert.

Gezeigt sind die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Replikaten

Die in dieser Arbeit verwendeten Infektionszeiten dauerten meistens nicht länger als 12 Stunden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass während der gesamten Versuche immer ausreichend Glukose im Medium vorhanden war. Bei den Versuchen ohne direkten Epithel- und Immunzell Kontakt mit den Zellkultureinsätzen, wurden Infektionszeiten von bis zu 24 Stunden durchgeführt. Hierbei wurde aber ständig Medium „nachgefüttert“, so dass auch hier keine Glukoselimitierung zu erwarten war.

3.3.6 Abhängigkeit der IL-8 Sekretion von der *C. albicans* MOI

Es wurden die Konzentrationen an IL-8, welches durch die Epithelzellen und Immunzellen sekretiert wurde, im Zusammenhang mit verschiedenen *C. albicans* Zellzahlen untersucht. Dabei wurden $5 \cdot 10^5$ Epithelzellen für 6 Stunden mit unterschiedlichen SC5314 Zellzahlen in

RPMI-Medium infiziert (2.2.7.2). Nach der Vorinfektion wurde das Medium zu RPMI⁺-Medium gewechselt und $5 \cdot 10^6$ PMNs oder $5 \cdot 10^6$ differenzierte HL-60 zu den infizierten Epithelzellen gegeben und die Zellen zusammen für weitere 6 Stunden inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und die IL-8 Konzentrationen nach 2.2.9.1 bestimmt.

Aufgrund der hohen IL-8 Konzentrationsunterschiede in den einzelnen Proben wurden die Ergebnisse der einzelnen Zellkombinationen getrennt voneinander aufgetragen (Abb. 3.18).

Allein die Anwesenheit von *C. albicans* bewirkte eine erhöhte IL-8 Sekretion in den Epithelzellen. Dabei muss angemerkt werden, dass erst ab einer IL-8 Konzentration von 15 pg/ml von verlässlichen Messwerten gesprochen werden kann. Der Wert für die Probe 100 *C. albicans* Zellen ohne Immunzellen lag mit 11 pg/ml unterhalb dieses Wertes. Auch nicht infizierte A431 Zellen zeigten eine Grundexpression von IL-8 im Bereich von 40 pg/ml. Erst ab einer *C. albicans* Zellzahl ab 10.000 Zellen / Well (MOI = 0,02) konnte eine signifikante Erhöhung der IL-8 Konzentration im Überstand beobachtet werden (Abb. 3.18 A). Allerdings zeigten sich bei den IL-8 Konzentrationen im unteren Bereich (bis zu 40 pg/ml) relativ große Schwankungen. Die Überstände mit 100, 500 und 1000 *C. albicans* Zellen wiesen kleinere IL-8 Konzentrationen auf, als die A431 ohne *C. albicans*. Die höchsten IL-8 Werte konnten, mit bis zu 120.000 pg/ml, in den Proben mit den HL-60 Zellen gemessen werden. Auch hier war ein proportionaler Anstieg der IL-8 Konzentrationen im Zusammenhang mit der *C. albicans* Zahl zu erkennen. Von den HL-60 Zellen ging jedoch auch ohne Hefezellen eine relativ hohe IL-8 Sekretion im Bereich von 16.000 pg/ml aus (Abb. 3.18 B). Auch für die Proben mit den PMNs war der Anstieg der Konzentrationen mit steigender *C. albicans* Zahl zu erkennen, hier lagen die Konzentrationen aber weit unter denen mit HL-60 Zellen und es war auch keine Grundsekretion von IL-8 ohne *C. albicans* Infektion zu messen (Abb. 3.18 C).

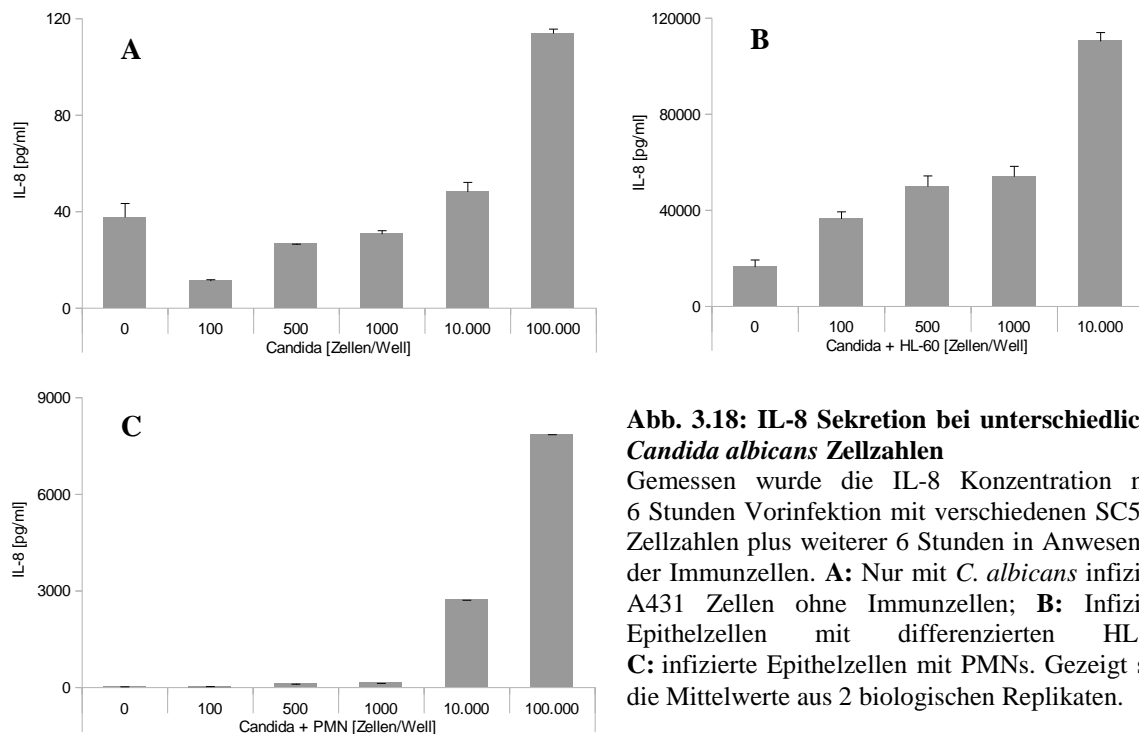


Abb. 3.18: IL-8 Sekretion bei unterschiedlichen *Candida albicans* Zellzahlen

Gemessen wurde die IL-8 Konzentration nach 6 Stunden Vorinfektion mit verschiedenen SC5314 Zellzahlen plus weiterer 6 Stunden in Anwesenheit der Immunzellen. **A:** Nur mit *C. albicans* infizierte A431 Zellen ohne Immunzellen; **B:** Infizierte Epithelzellen mit differenzierten HL-60; **C:** infizierte Epithelzellen mit PMNs. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 2 biologischen Replikaten.

Die IL-8 Sekretion von *C. albicans* infizierten PMNs und HL-60 Zellen wurde bei diesem Versuch nicht mitbestimmt. Die IL-8 Konzentrationen in den Überständen dieser Infektion wurden in Abschnitt 3.3.8 ermittelt.

3.3.7 Genexpressionsanalysen mittels Microarrays

Mit Hilfe der Microarraytechnik wurde die Genexpression der A431 Zellen während einer Infektion mit *C. albicans* bei An- und Abwesenheit von PMNs und HL-60 Zellen analysiert. Es sollten die Gene identifiziert werden, deren Expressionen während der Infektion reguliert wurden. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Gene von Chemokinen, Zytokinen und Rezeptoren, die eine Rolle in der Immunantwort spielen könnten, gelegt. Anhand der Daten sollte ein erster Anhaltspunkt für wichtige Proteine, die als Antwort der Epithelzellen auf eine Infektion mit *Candida albicans* von Bedeutung sind, gewonnen werden.

Außerdem sollten eventuelle Veränderungen der Expressionsmuster bei Anwesenheit von Immunzellen untersucht und somit die Rolle des Immunsystems bei der Infektion aufgeklärt werden.

Des Weiteren wurden auch verschiedene Infektionszeiten untersucht, um herauszufinden ab welchen Inkubationszeiten sich das Expressionsverhalten der Zellen ändert.

Für die erste Probenreihe wurden $5 \cdot 10^5$ A431 Zellen wie in 2.2.11 beschrieben kultiviert und für insgesamt 6 Stunden mit $5 \cdot 10^5$ *C. albicans* infiziert. Nach 1 h, 3 h und 6 h Infektionszeit wurde die RNA von den Epithelzellen isoliert und die RNA Konzentration und Qualität bestimmt (2.2.11.1). Nach 6 Stunden Vorinfektion wurden entweder $5 \cdot 10^6$ PMNs oder $5 \cdot 10^6$ HL-60 Zellen (6 Tage differenziert) zu den infizierten Epithelzellen gegeben und für weitere 1 h und 3 h inkubiert (Zeitpunkte 7 h und 9 h). Parallel wurden auch zu diesen Zeitpunkten Proben von infizierten Epithelzellen ohne Immunzellen genommen. Anschließend wurde ebenfalls die RNA von den Epithelzellen isoliert und die RNA Konzentration und Qualität bestimmt.

Die Analyse der Proben mittels *Whole Human Genome 4 * 44k* Microarrays von Agilent erfolgte nach 2.2.11.3.

Änderungen in der Genexpression werden im Bezug auf einen Referenzzustand ermittelt. Daher wurde zu jedem Zeitpunkt die RNA aus nichtinfizierten A431 isoliert und das Expressionsmuster des Grundzustandes dadurch ermittelt. Dieser Grundzustand wurde mit dem Expressionsmuster infizierter A431 verglichen und damit die Anzahl der regulierten Gene ermittelt (Tab. 3.1 und Tab. 3.2). Um statistisch signifikante Werte zu erhalten, wurden sämtliche Untersuchungen dreimal wiederholt und der p-value aus diesen Wiederholungen für jedes Gen berechnet. Als signifikant reguliert galt ein Gen, wenn seine Expression einen p-value $< 0,01$ aufwies und das entsprechende Gen mindestens mit dem Faktor 2 zur Vergleichsprobe reguliert wurde.

Tab. 3.3: Signifikant regulierte Gene der A431 Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten

Gezeigt ist die Anzahl der induzierten und reprimierten Gene der jeweiligen Proben und Zeitpunkte mit einem p-value $< 0,01$ und einem Fold Change > 2 . In Klammern ist die Anzahl der Gene mit bekannter Funktion gezeigt.

	induzierte Gene	reprimierte Gene
A431 + Caa 1 h	2 (1)	36 (5)
A431 + Caa 3 h	2 (2)	1 (1)
A431 + Caa 6 h	34 (23)	2 (1)
A431 + Caa 7 h	41 (29)	3 (0)
A431 + Caa 9 h	65 (46)	5 (4)
A431 + Caa + PMN 7 h	804 (681)	61 (30)
A431 + Caa + PMN 9 h	902 (752)	122 (90)

Aus Tab. 3.3 wird ersichtlich, dass bereits nach einer Stunde Inkubation mit den Immunzellen eine deutliche Erhöhung der Zahl der regulierten Gene beobachtet wurde. Der Unterschied in den Zahlen der regulierten Gene zwischen 7 und 9 Stunden war nur noch gering. Die Genregulation war also eine sehr schnelle und frühe Antwort auf die Anwesenheit von Immunzellen während einer Infektion mit *C. albicans*. Im Gegensatz zu den Proben ohne PMNs wurden in denen mit PMNs etwa 10 - 20-mal mehr Gene induziert oder reprimiert.

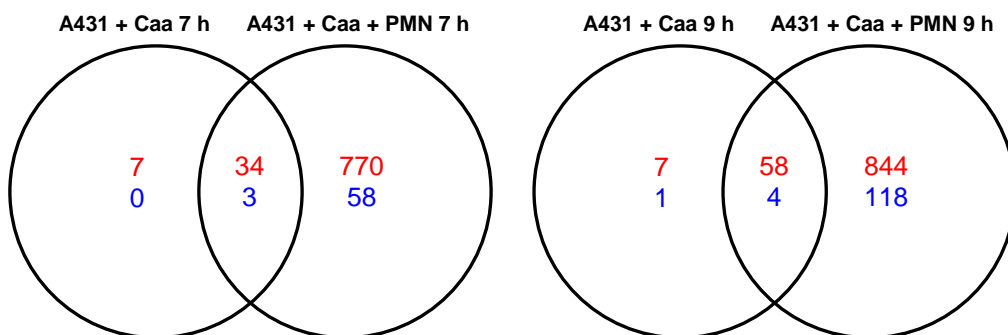


Abb. 3.19: Venn Diagramme der *C. albicans* infizierten Epithelzellen mit und ohne PMNs nach 7 und 9 Stunden

Der Großteil der Gene, die aufgrund der Infektion mit *C. albicans* reguliert wurden, wurden auch in den infizierten Epithelzellen mit PMNs reguliert. Rot: Induzierte Gene; blau: reprimierte Gene

Die meisten der Gene, die durch die Anwesenheit von *C. albicans* nach 7 h induziert waren, waren auch 1 h nach PMN Zugabe induziert. Nach 7 Stunden Infektion waren 34 (83 %) der in den infizierten Epithelzellen regulierten Gene auch in denen mit Neutrophilen reguliert, nach 9 Stunden Infektion betrug die Übereinstimmung 89 % (Abb. 3.19).

In den folgenden Tabellen (Tab. 3.4 - Tab. 3.14) werden die am stärksten regulierten Gene aus den Venn Diagrammen aufgelistet. Es werden die Gene getrennt aufgezählt, die entweder nur in einer der beiden Proben reguliert wurden oder in beiden Proben gemeinsam. Wenn kein Gen Symbol und kein Gen Name in den Spalten angegeben ist, handelt es sich um ein unbekanntes Gen, dem noch keine Funktion zugeordnet werden konnte. Wenn in einer Probe nur Gene ohne relevante Funktion für die Infektion reguliert wurden, ist die dazugehörige Tabelle im Anhang dargestellt. Nur die Tabellen, in denen relevante Gene gelistet werden, sind in diesem Abschnitt gezeigt und diskutiert. Es sind maximal die 50 am stärksten regulierten Gene dargestellt. Die Dateien mit den vollständigen Tabellen aller signifikant regulierten Gene sind auf der beigefügten DVD gespeichert.

Tab. 3.4 (im Anhang) zeigt die 7 induzierten Gene, die nur in der Probe A431 + Caa nach 7 h Infektion reguliert wurden. Für keines der Gene ist eine für die Infektion relevante Funktion bekannt.

Tab. 3.5 zeigt die 34 Gene, die gemeinsam in den beiden Proben A431 + Caa 7 h und A431 + Caa + PMN 7 h signifikant induziert wurden. Die rot markierten Gene sind auch in mindestens einer der anderen Tabellen mit gemeinsam induzierten Genen aufgeführt. Da diese Gene mehrmals im Zusammenhang mit *C. albicans* induziert wurden, scheinen sie eine wichtige Funktion bei der Antwort der Zellen auf eine Infektion zu besitzen.

Tab. 3.5: Gemeinsam induzierte Gene der Proben A431 + *Candida albicans* 7 h und A431 + *Candida albicans* + PMN 7 h

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_Caa_7h	pvalue_A431_Caa_7h	FC_A431_Caa_PMN_7h	pvalue_A431_Caa_PMN_7h
		18.4656	1.09E-07	14.4555	3.25E-08
ASB2	ankyrin repeat and SOCS box-containing 2	15.2891	0.002063	19.8560	2.67E-05
		12.6580	5.44E-07	11.3827	5.28E-08
TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial (venous malformations, multiple cutaneous and mucosal)	10.6045	6.07E-05	8.3679	2.53E-05
		10.2631	1.43E-06	6.1430	1.47E-05
		8.9049	7.41E-03	7.1493	2.56E-03
GAL3ST1	galactose-3-O-sulfotransferase 1	7.1696	7.75E-05	5.3997	8.18E-05
		7.0511	0.000527	7.6332	1.69E-05
EGLN3	egl nine homolog 3 (<i>C. elegans</i>)	6.9298	2.05E-09	6.9847	4.51E-11
		6.1772	3.20E-06	5.0133	2.03E-06
		6.0283	0.000200	4.8101	0.000147
		5.8939	0.000101	6.9199	9.17E-07
ANKRD37	ankyrin repeat domain 37	5.7795	5.07E-07	4.2415	1.65E-06
NDRG1	N-myc downstream regulated gene 1	5.3226	0.000203	6.1458	2.31E-06
PFKFB4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4	5.2680	9.99E-06	5.3452	3.40E-07
PPFIA4	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 4	5.2515	6.82E-06	3.9363	1.78E-05
WISP1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	4.6605	6.27E-06	3.3705	3.74E-05
		4.2604	1.00E-06	3.1794	6.53E-06
GPR146	G protein-coupled receptor 146	4.2097	1.01E-04	3.8237	2.37E-05
C10orf10	chromosome 10 open reading frame 10	3.8328	5.19E-03	3.5262	1.03E-03
		3.7757	0.002800	3.5909	0.000369
KCTD11	potassium channel tetramerisation domain containing 11	3.5377	0.002800	3.0181	0.001522
HIG2	hypoxia-inducible protein 2	3.5293	2.05E-09	3.0264	1.18E-09
FLJ40722	hypothetical protein FLJ40722	3.4773	2.05E-09	3.0556	1.46E-09
ADM	adrenomedullin	3.4542	0.007046	4.3238	3.25E-05
ARID3A	AT rich interactive domain 3A (BRIGHT-like)	3.2969	0.000379	4.1823	5.14E-07
LRIG1	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1	2.7953	5.37E-04	2.5939	0.000144
		2.7302	0.002431	2.6511	0.000269
FUT11	fucosyltransferase 11 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	2.6338	2.05E-09	2.4382	4.65E-10
JMJD1A	jumonji domain containing 1A	2.4737	2.70E-03	2.6470	5.41E-05
ENO2	enolase 2 (gamma, neuronal)	2.3915	2.16E-05	2.3319	1.76E-06
STC2	stanniocalcin 2	2.3758	0.000188	2.0690	0.000255
ANKZF1	ankyrin repeat and zinc finger domain containing 1	2.3507	3.81E-08	2.0676	7.86E-08
FOSL2	FOS-like antigen 2	2.0953	0.005915	2.8630	5.09E-07

Im Folgenden werden die Funktionen der rot markierten Gene und der Proteine, die durch diese Gene codiert werden, näher erläutert. Die Informationen stammen alle von der NCBI Website [www.ncbi.nlm.nih.gov].

ASB2: das Gen spielt bei der Retinsäure induzierten Wachstumsinhibierung und an der Differenzierung von myeloiden Leukämiezellen eine Rolle. Das Protein ist am Abbau von Proteinen beteiligt.

TEK: das Protein spielt eine entscheidende Rolle bei der Kommunikation zwischen Endothel- und glatten Muskelzellen bei der Morphogenese von Venen.

GAL3ST1: das Genprodukt, die Galactosylceramidsulfontransferase, katalysiert die Umwandlung von 3'-Phosphoadenylylsulfat und α -Galactosylceramid zu Adenosin 3',5'-bisphosphat + Galactosylceramidsulfat

EGLN3: keine weitere Funktion bekannt.

ANKRD37: keine weitere Funktion bekannt.

NDRG1: das Protein ist im Zytoplasma lokalisiert und in die Stress- und Hormonantwort, Zellwachstum und Differenzierung involviert. Es ist notwendig für die p53 vermittelte Caspaseaktivierung und die Apoptose.

PFKFB4: keine weitere Funktion bekannt.

PPFIA4: das Protein gehört zur Familie der Liprine. Liprin regulieren die Ablösung von fokalen Adhäsionen.

WISP1: das Protein verringert die p53 vermittelte Apoptose indem es die Akt-Kinase aktiviert.

GPR146: keine weitere Funktion bekannt.

C10orf10: die Produktion des codierten Proteins führt zu einer Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktor ELK1.

KCTD11: keine weitere Funktion bekannt.

HIG2: keine weitere Funktion bekannt.

FLJ40722: keine weitere Funktion bekannt.

ADM: das Protein hat möglicherweise eine Hormonfunktion in der Blutkreislaufkontrolle, da es in erheblichen Mengen im Blut vorkommt.

ARID3A: die Proteine der ARID Familie haben eine Funktion in der Zellzykluskontrolle, der transkriptionalen Regulation und möglicherweise in der Chromatinstruktur-modifikation.

LRIG1: keine weitere Funktion bekannt.

FUT11: keine weitere Funktion bekannt.

JMJD1A: das Protein ist möglicherweise an der hormonabhängigen transkriptionalen Aktivierung beteiligt.

ENO2: keine weitere Funktion bekannt.

STC2: das Protein spielt möglicherweise eine Rolle in der Regulation des Calcium- und Phosphattransport in Niere und Darm, im Zellmetabolismus und in der zellulären Calcium/Phosphat Homeostase.

ANKZF1: keine weitere Funktion bekannt.

FOSL2: gehört zur Familie der Fos Gene und codiert ein Leucin-Zipper-Protein. Diese sind für die Dimerisierung der Jun Proteine verantwortlich, wodurch der Transkriptionsfaktor AP-1 gebildet wird.

EFNA1: die Proteine sind die Liganden für die Ephrinrezeptoren. Sie spielen eine Rolle in der Embryogenese, Zellmigration und der Erythropoese.

DAPK2: das Protein ist ein positiver Regulator der Apoptose.

PDK1: das Protein katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat und ist eines der wichtigsten Enzyme der Homöostase.

Die Tabelle 3.6 (im Anhang) listet die Gene auf, die in beiden Proben A431 + Caa 7 h und A431 + Caa + PMN 7 h reprimiert wurden. Für keines dieser Gene ist eine Funktion bekannt.

In Tab. 3.7 sind die 50 am stärksten induzierten Gene, die nur in der Probe A431 + Caa + PMN 7 h reguliert wurden, aufgelistet. Für die Infektion interessante Gene sind blau markiert. Bei diesen Genen handelt es sich um Zytokine oder Zytokinassoziierte Gene oder um Gene, die für Rezeptoren codieren.

Tab. 3.7: 50 am stärksten induzierte Gene der Probe A431 + *Candida albicans* + PMN 7 h

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_Ca a_PMN_7h	pvalue_A431_ Caa_PMN_7h
G0S2	G0/G1switch 2	38416.366	1.08E-15
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	31785.185	3.89E-15
PRG1	proteoglycan 1, secretory granule	9084.628	8.74E-12
FCGR3A	Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a)	6977.459	4.62E-12
RGS2	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa	6096.790	1.20E-15
AQP9	aquaporin 9	4835.499	9.10E-12
OSM	oncostatin M	3510.930	1.36E-17
RASSF2	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2	3325.450	3.19E-14
TREM1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1	2563.308	5.86E-16
CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4	2193.308	1.45E-07
MNDA	myeloid cell nuclear differentiation antigen	1904.380	5.27E-13
AIF1	allograft inflammatory factor 1	1769.338	2.81E-09
S100A8	S100 calcium binding protein A8	1671.239	3.67E-10
LCP2	lymphocyte cytosolic protein 2 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa)	1506.559	6.21E-09
LSP1	lymphocyte-specific protein 1	1377.145	4.23E-13
CLEC4E	C-type lectin domain family 4, member E	1244.955	5.63E-15
RGR	Ral-GDS related protein Rgr	1196.766	1.89E-13
HBB	hemoglobin, beta	1114.594	1.00E-12
CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3	1040.955	2.92E-07
TNFAIP6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	1006.251	2.78E-10
CD53	CD53 molecule	1002.457	4.84E-10
BASP1	brain abundant, membrane attached signal protein 1	880.462	1.67E-15
PSCDBP	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains, binding protein	841.223	6.58E-16
LILRB2	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 2	839.108	5.53E-13
PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	827.263	6.41E-15
AMICA1	adhesion molecule, interacts with CXADR antigen 1	814.662	4.66E-14
GPR65	G protein-coupled receptor 65	810.630	1.53E-18
DEFA3	defensin, alpha 3, neutrophil-specific	696.279	7.45E-06
		682.986	1.65E-12
TRAF3IP3	TRAF3 interacting protein 3	595.321	3.69E-12
PLEK	pleckstrin	589.726	2.00E-09
GLT1D1	glycosyltransferase 1 domain containing 1	588.509	1.34E-12
PROK2	prokineticin 2	581.173	1.08E-15
FPR1	formyl peptide receptor 1	577.124	1.88E-17
ARHGAP25	Rho GTPase activating protein 25	539.311	4.51E-11
TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	526.737	1.09E-15
TYROBP	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	513.080	7.05E-13
LAPTM5	lysosomal associated multispinning membrane protein 5	485.549	1.50E-15
SAMSN1	SAM domain, SH3 domain and nuclear localization signals 1	478.240	2.93E-11
PECAM1	platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)	460.665	1.17E-09
FPRL1	formyl peptide receptor-like 1	437.006	1.28E-13
RGS18	regulator of G-protein signalling 18	413.459	3.07E-13
ALOX5AP	arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	403.398	4.90E-11
IL18RAP	interleukin 18 receptor accessory protein	391.493	4.04E-14
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	371.675	1.93E-14
CD69	CD69 molecule	368.963	1.21E-14
RGS1	regulator of G-protein signalling 1	357.177	3.46E-11
CCL3L3	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	344.614	2.05E-07
PDE4B	phosphodiesterase 4B, cAMP-specific (phosphodiesterase E4 dunce homolog, Drosophila)	331.312	7.02E-12
CLC	Charcot-Leyden crystal protein	324.517	5.27E-13

Tab. 3.8 (im Anhang) zeigt die reprimierten Gene der Probe A431 + Caa + PMN 7 h. Da hier keine allzu starke Regulation stattgefunden hat, werden nur die 20 am stärksten reprimierten Gene aufgelistet. Auch in dieser Liste war kein für die Infektion relevantes Gen enthalten.

Die Tabellen 3.9 und 3.10 (im Anhang) zeigen die induzierten und reprimierten Gene der *C. albicans* infizierten A431 nach 9 h. Auch hier ist kein relevantes Gen reguliert worden.

In Tab. 3.11 sind die Gene gelistet, die in beiden Proben A431 + Caa 9 h und A431 + Caa + PMN 9 h induziert worden sind. Die Gene, die auch in den anderen Tabellen mit gemeinsamer Induktion aufgeführt werden, sind wieder in rot dargestellt.

Tab. 3.11: Gemeinsam induzierte Gene der Proben A431 + *Candida albicans* 9 h und A431 + *Candida albicans* + PMN 9 h

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_ Caa_9h	pvalue_A431_ Caa_9h	FC_A431_ Caa_PMN_ 9h	pvalue_A431_ Caa_PMN_9h
		26.1844	2.48E-09	28.7768	6.49E-11
		23.4662	9.29E-10	24.6817	2.91E-11
		18.7679	5.20E-08	14.8156	2.85E-08
		14.7182	2.04E-08	11.5132	1.62E-08
ASB2	ankyrin repeat and SOCS box-containing 2	14.5226	0.00207	21.6443	1.46E-05
TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial (venous malformations, multiple cutaneous and mucosal)	9.2073	0.00013	7.6242	5.40E-05
C10orf10	chromosome 10 open reading frame 10	9.1228	1.90E-07	9.1771	1.06E-08
ANKRD37	ankyrin repeat domain 37	9.0505	6.50E-10	8.7590	4.38E-11
EGLN3	egl nine homolog 3 (<i>C. elegans</i>)	8.9628	4.44E-11	8.1101	6.40E-12
		8.1837	0.00867	10.7144	0.00015
NDRG1	N-myc downstream regulated gene 1	7.6387	2.60E-06	6.7045	8.58E-07
ADM	adrenomedullin	7.5189	4.36E-07	7.2338	4.19E-08
GAL3ST1	galactose-3-O-sulfotransferase 1	6.4145	0.00016	6.0281	2.41E-05
		6.3378	1.34E-06	5.3620	8.58E-07
LOC652795	similar to hypothetical protein FLJ40722	6.1525	0.00663	5.6703	0.00121
EDN2	endothelin 2	5.9543	0.001181	5.2881	0.00029
DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4	5.8941	4.73E-06	5.2655	1.48E-06
BHLHB2	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	5.8552	0.00056	6.3393	2.00E-05
PPFIA4	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 4	5.7298	1.32E-06	5.1669	3.67E-07
		5.6141	0.00033	6.0358	1.18E-05
		5.4465	2.30E-06	6.9258	5.35E-09
		4.9531	8.70E-05	6.2811	3.10E-07
GPR146	G protein-coupled receptor 146	4.3032	5.82E-05	4.0908	8.61E-06
PFKFB4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4	4.2797	0.00011	4.3594	6.03E-06
ARRDC3	arrestin domain containing 3	4.2249	0.00309	6.9241	1.02E-06
HIG2	hypoxia-inducible protein 2	4.1495	4.34E-11	4.0601	1.40E-12
KCTD11	potassium channel tetramerisation domain containing 11	4.1007	0.00034	4.5021	7.84E-06
		3.9826	0.00514	4.7885	6.21E-05
		3.9354	4.73E-06	3.4819	2.63E-06
FLJ40722	hypothetical protein FLJ40722	3.8574	1.74E-10	4.0046	2.98E-12
		3.8531	0.00602	4.1303	0.00026
ARID3A	AT rich interactive domain 3A (BRIGHT-like)	3.5104	0.00011	3.8840	1.73E-06
LRIG1	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1	3.3733	1.73E-05	2.8616	2.30E-05
		3.3455	3.52E-05	2.8417	4.45E-05

MXI1	MAX interactor 1	3.3389	0.00721	2.9508	0.00292
		3.1335	0.00014	16.9180	9.03E-17
JMJD1A	jumonji domain containing 1A	3.1302	3.07E-05	2.6746	4.17E-05
WISP1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	3.0736	0.00168	2.4093	0.00403
ELF3	E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific)	2.9436	0.00867	2.6180	0.00379
PIM1	pim-1 oncogene	2.9286	6.07E-07	2.9087	4.55E-08
INSIG2	insulin induced gene 2	2.8110	8.34E-06	2.3878	2.07E-05
ENO2	enolase 2 (gamma, neuronal)	2.7287	5.09E-07	2.4980	3.11E-07
EFNA1	ephrin-A1	2.6793	0.00672	2.3796	0.00340
		2.6188	0.00375	2.1029	0.00824
DAPK2	death-associated protein kinase 2	2.5884	0.00340	3.0969	1.51E-05
ANKZF1	ankyrin repeat and zinc finger domain containing 1	2.5359	2.03E-09	2.1827	1.34E-08
FUT11	fucosyltransferase 11 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	2.5351	2.48E-09	2.2706	5.53E-09
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	2.4199	9.59E-09	2.0186	2.37E-07
		2.4027	0.006203	2.3400	0.00092
PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	2.3721	1.56E-07	2.2263	6.26E-08

Den gemeinsam reprimierten Genen in Tab 3.12 (im Anhang) konnte keine infektionsrelevante Funktion zugeordnet werden.

Tab. 3.13 zeigt die 50 am stärksten induzierten Gene der *C. albicans* infizierten A431 mit PMNs nach 9 h. Interessante Gene sind wieder blau markiert. In Tab 3.14 sind die reprimierten Gene der Probe aufgeführt. Hier war wieder kein relevantes Gen dabei.

Tab. 3.13: 50 am stärksten induzierte Gene der Probe A431 + *Candida albicans* + PMN 9 h

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_Caa_PMN_9h	pvalue_A431_Caa_PMN_9h
G0S2	G0/G1switch 2	33361.086	1.58E-15
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	26620.720	7.31E-15
PRG1	proteoglycan 1, secretory granule	15208.008	2.21E-12
OSM	oncostatin M	6976.457	2.75E-19
AQP9	aquaporin 9	6021.501	5.64E-12
TREM1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1	4440.181	4.04E-17
FCGR3A	Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a)	3304.449	8.30E-11
CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4	2741.359	7.57E-08
HBB	hemoglobin, beta	2036.926	9.72E-14
CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3	1788.248	4.86E-08
		1448.278	7.20E-14
LSP1	lymphocyte-specific protein 1	1401.939	5.06E-13
PROK2	prokineticin 2	1290.583	1.72E-17
CD53	CD53 molecule	1257.052	2.21E-10
PLEK	pleckstrin	1220.738	1.09E-10
RGS2	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa	1193.790	1.24E-12
SAMSN1	SAM domain, SH3 domain and nuclear localization signals 1	1075.982	1.00E-12
RGR	Ral-GDS related protein Rgr	1054.453	4.57E-13
TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	962.377	5.20E-17
RASSF2	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2	915.005	1.01E-11
PSCDBP	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains, binding protein	846.618	4.07E-16

BASP1	brain abundant, membrane attached signal protein 1	833.243	2.21E-15
CCL3L3	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	808.156	6.99E-09
AIF1	allograft inflammatory factor 1	784.110	6.37E-08
MNDA	myeloid cell nuclear differentiation antigen	718.749	4.38E-11
PHACTR1	phosphatase and actin regulator 1	716.477	2.21E-15
IL8	interleukin 8	678.809	7.12E-11
ALOX5AP	arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	608.225	8.66E-12
PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	582.363	5.01E-14
S100A8	S100 calcium binding protein A8	566.585	3.02E-08
CD69	CD69 molecule	468.521	3.79E-15
TRAF3IP3	TRAF3 interacting protein 3	463.298	1.63E-11
GPR65	G protein-coupled receptor 65	461.467	1.44E-17
TYROBP	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	423.017	2.21E-12
AMICA1	adhesion molecule, interacts with CXADR antigen 1	410.566	2.02E-12
LCP2	lymphocyte cytosolic protein 2 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa)	408.030	9.12E-07
TNFAIP6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	406.687	1.54E-08
IL18RAP	interleukin 18 receptor accessory protein	396.564	5.42E-14
C13orf18	chromosome 13 open reading frame 18	395.861	3.55E-12
LAPTM5	lysosomal associated multispinning membrane protein 5	393.320	4.94E-15
CLEC4E	C-type lectin domain family 4, member E	357.722	3.08E-12
TAGAP	T-cell activation GTPase activating protein	350.534	2.25E-14
FPR1	formyl peptide receptor 1	346.613	2.21E-16
TNFSF14	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14	333.036	2.47E-10
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	320.588	1.02E-16
SLC2A3	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	318.946	2.10E-20
DEFA3	defensin, alpha 3, neutrophil-specific	290.980	0.00010232
PDE4B	phosphodiesterase 4B, cAMP-specific (phosphodiesterase E4 dunce homolog, Drosophila)	276.945	2.46E-11
LILRB2	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 2	269.555	1.65E-10
FPRL1	formyl peptide receptor-like 1	268.551	2.21E-12

Die meisten der Gene die nach 7 h reguliert worden waren, waren auch nach 9 h reguliert. Einer Vielzahl an Genen, die gemeinsam reguliert wurden (Tab. 3.5 und Tab 3.11) konnte keine Funktion zugeordnet werden.

In einer zweiten, von der ersten unabhängigen Probenserie wurde der Einfluss, den die Immunzellen auf die Genregulation in den Epithelzellen hatten, ermittelt. Dazu wurden zusätzlich Epithelzellen und Neutrophile zusammen kultiviert. Um weitere Aufschlüsse über die Zeitkonstanten während der Genexpression zu bekommen, wurde die RNA bereits 30 min nach Immunzell Zugabe isoliert. In diesem Versuch wurden auch HL-60 Zellen zu den Epithelzellen gegeben um zu ermitteln, ob sich die Zellen in Bezug auf die Induktion der Genregulation in den Epithelzellen, ähnlich wie die PMNs verhielten. Die Proben wurden analog zu der ersten Probenserie behandelt (6 h Vorinfektion mit *C. albicans*, anschließend

Zugabe von PMNs oder HL-60, nach 30 min RNA Isolation). Die Anzahl der regulierten Gene ist in Tab. 3.15 dargestellt.

Tab. 3.15: Regulierte Gene der A431 Zellen nach 6,5 h

Gezeigt ist die Anzahl der induzierten und reprimierten Gene der jeweiligen Proben und Zeitpunkte mit einem p-value < 0,01 und einem Fold Change > 2. In Klammern ist die Anzahl der Gene mit bekannter Funktion gezeigt

6,5 h	induzierte Gene	reprimierte Gene
A431 + Caa	101 (74)	22 (18)
A431 + Caa + PMN	784 (680)	95 (65)
A431 + Caa + HL-60	698 (604)	90 (63)
A431 + PMN	12 (12)	0 (0)
A431 + HL-60	14 (13)	0 (0)

Bei dieser Probenserie wurden in den für 6,5 h mit *C. albicans* infizierten Epithelzellen deutlich mehr Gene reguliert als in der ersten Probenserie nach 6 h oder 7 h (Tab. 3.3). Die Zellen reagieren schon auf kleinste Unterschiede während der Kultivierung (Temperaturschwankungen, Medienwechsel, pH-Wert) mit Veränderungen in der Genregulation. Da es äußerst schwierig ist sämtliche Umgebungsparameter während der einzelnen Versuche konstant zu halten, könnte dies die Schwankungen in den Zahlen der regulierten Gene der infizierten A431 erklären.

Es zeigte sich, dass schon 30 min nach Immunzellzugabe eine Regulation von Genen in den Epithelzellen stattgefunden hatte. Die Regulation war in den Proben A431 + *C. albicans* + PMN wieder deutlich höher als in den Proben A431 + *C. albicans*.

Das gleiche Muster zeigte sich auch in den Proben bei denen HL-60 anstelle von PMNs zugeben wurden. Die Cokultivierung der A431 Zellen mit PMNs oder HL-60 Zellen ohne *C. albicans* löste jedoch nur eine geringe Genregulation in den Epithelzellen aus.

Aus dem in Abb. 3.20 gezeigtem Venn Diagramm werden wieder die Übereinstimmungen der Genregulation der einzelnen Proben deutlich.

85 Gene (72 induzierte und 13 reprimierte) wurden in allen 3 Proben gemeinsam reguliert. 60 % der induzierten Gene der Probe A431 + Caa + PMN wurden auch in der Probe A431 + Caa + HL-60 induziert.

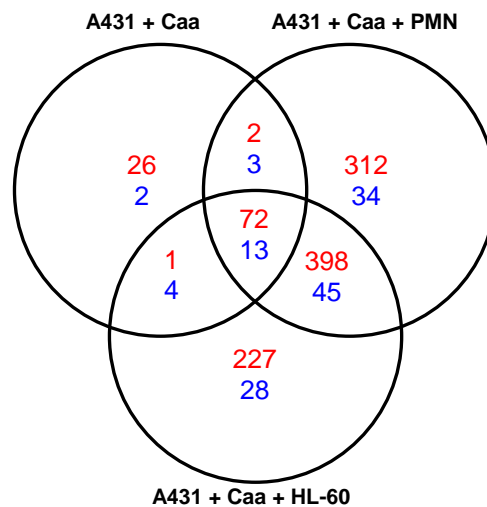


Abb. 3.20: Venn Diagramm der *Candida* infizierten Epithelzellen mit und ohne PMNs oder HL-60 nach 6,5 Stunden

Der Großteil der Gene, die aufgrund der Infektion mit *C. albicans* reguliert wurden, wurden auch in den infizierten Epithelzellen mit PMNs oder HL-60 reguliert. Rot: Induzierte Gene; blau: reprimierte Gene

Die Kultivierung von allen 3 Zelltypen zeigte, wie schon in Abb. 3.19, die höchste Genregulation in den Epithelzellen. Wenn entweder die Immunzellen oder *C. albicans* bei der Kultivierung fehlten, zeigten die A431 eine deutlich schwächere Genregulation. Dies zeigt, dass die Neutrophile die Immunantwort in *C. albicans* infizierten Epithelzellen deutlich verstärkten. Die Epithelzellen mussten also erst von den Immunzellen „aktiviert“ werden, damit sie auf eine Infektion mit *C. albicans* reagierten.

In den folgenden Tabellen (Tab. 3.16 - Tab. 3.29) sind die am stärksten regulierten Gene aus den Venn Diagrammen aufgelistet. Die Dateien mit den vollständigen Tabellen mit allen signifikant regulierten Genen sind auf der beigefügten DVD gespeichert. In blau werden wieder die Gene hervorgehoben, die für diese Arbeit interessante Proteine codieren.

In Tab 3. 16 sind die induzierten und in Tab 3.17 die reprimierten Gene der Probe A431 + Caa dargestellt. Keines dieser Gene hat eine Infektionsrelevante Funktion.

Tab. 3.18 zeigt die Gene, die nur in den Proben A431 + Caa und A431 + Caa + PMN gemeinsam reguliert wurden. In rot sind wieder die Gene markiert, die auch in den

Vergleichen der anderen Proben reguliert waren. Tab 3.19 (im Anhang) zeigt die reprimierten Gene dieser Probe.

Tab. 3.18: Gemeinsam induzierte Gene der Proben A431 + *Candida albicans* und A431 + *Candida albicans* + PMN

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_ Caa	pvalue_A431_ Caa	FC_A431_ Caa_PMN	pvalue_A431_ Caa_PMN
PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	2.2485	6.20E-07	2.0803	5.07E-07
EGLN1	egl nine homolog 1 (C. elegans)	2.1191	3.95E-07	2.0683	5.38E-08

Tab. 3.20 zeigt die 50 am stärksten induzierten Gene die nur in der Probe A431 + Caa + PMN reguliert wurden. Tab. 3.21 mit den reprimierten Genen ist im Anhang zu finden, da hier wieder kein relevantes Gen reguliert wurde.

Tab. 3.20: 50 am stärksten induzierte Gene der Probe A431 + *Candida albicans* + PMN

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_ Caa_PMN	pvalue_A431_ Caa_PMN
FCGR3A	Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a)	5553.9268	1.19E-11
GLT1D1	glycosyltransferase 1 domain containing 1	675.1288	7.84E-13
APOBEC3A	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	585.6432	4.76E-07
HBB	hemoglobin, beta	570.5045	2.44E-11
FCGR3B	Fc fragment of IgG, low affinity IIIb, receptor (CD16b)	506.7483	8.13E-14
C6orf32	chromosome 6 open reading frame 32	270.1178	1.72E-10
GIMAP4	GTPase, IMAP family member 4	243.0430	1.32E-14
VNN2	vanin 2	203.3588	1.70E-06
IL8RB	interleukin 8 receptor, beta	203.2157	1.83E-14
HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	147.1206	6.43E-14
C6orf32	chromosome 6 open reading frame 32	138.3271	6.77E-09
GBP5	guanylate binding protein 5	134.0940	2.85E-12
TNFRSF10C	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c, decoy without an intracellular domain	111.6532	5.22E-10
SELL	selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)	106.3784	3.12E-15
SLC40A1	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	103.8647	3.92E-13
C13orf18	chromosome 13 open reading frame 18	100.8795	5.89E-09
IL8RA	interleukin 8 receptor, alpha	86.6601	1.11E-14
BTNL8	butyrophilin-like 8	86.1163	2.43E-12
P2RY14	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	86.0430	2.99E-07
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	84.4728	4.80E-10
MME	membrane metallo-endopeptidase (neutral endopeptidase, enkephalinase)	71.8601	3.25E-15
CD69	CD69 molecule	71.3508	3.12E-10
		64.5597	1.07E-08
TNFSF12	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12	62.6831	2.84E-08
CA4	carbonic anhydrase IV	57.0697	2.83E-09
IL2RG	interleukin 2 receptor, gamma (severe combined immunodeficiency)	54.6893	3.57E-09
FAM49A	family with sequence similarity 49, member A	54.5543	4.55E-14
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	53.5768	1.55E-11
IL8RBP	interleukin 8 receptor, beta pseudogene	52.4149	7.61E-12
KCNJ15	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15	51.1653	7.16E-11
VNN3	vanin 3	45.4653	8.32E-09
GALC	galactosylceramidase	44.3505	1.03E-11

LOC158830	similar to Ab2-183	44.1418	8.09E-10
		42.1997	9.87E-07
LTF	lactotransferrin	41.4525	2.20E-10
C22orf37	chromosome 22 open reading frame 37	40.1361	1.12E-12
PHACTR1	phosphatase and actin regulator 1	38.6414	3.44E-12
GIMAP7	GTPase, IMAP family member 7	34.9524	5.88E-08
FLJ14213	hypothetical protein FLJ14213	31.8361	2.16E-14
CREB5	cAMP responsive element binding protein 5	31.8241	3.42E-09
FCER1A	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide	30.0825	7.16E-11
PLXNC1	plexin C1	29.6553	3.74E-09
CD93	CD93 molecule	29.3199	2.44E-10
GPR44	G protein-coupled receptor 44	28.4446	3.25E-12
		27.4593	5.48E-09
TNFSF13B	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	26.7905	1.09E-08
PLXNC1	plexin C1	26.2695	2.21E-06
CAMK1D	calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID	25.1288	0.000204
HAL	histidine ammonia-lyase	25.0293	4.54E-06
		24.5441	1.20E-07

Tab. 3.22 zeigt die Gene, die in beiden Proben A431 + Caa + PMN und A431 + Caa + HL-60 induziert wurden. Tab. 2.23 (im Anhang) zeigt die reprimierten Gene.

Tab. 3.22: 50 am stärksten induzierte Gene der Proben A431 + *Candida albicans* + PMN und A431 + *Candida albicans* + HL-60

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_Caa_PMN	pvalue_A431_Caa_PMN	FC_A431_Caa_HL60	pvalue_A431_Caa_HL60
G0S2	G0/G1switch 2	19638.0102	9.98E-15	145.5345	2.36E-06
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	10330.2419	1.57E-13	1285.7836	4.25E-10
RGS2	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa	3660.6350	9.98E-15	1165.5067	1.23E-12
PRG1	proteoglycan 1, secretory granule	3124.2040	4.00E-10	2201.2753	1.56E-09
AQP9	aquaporin 9	2467.2681	1.25E-10	123.2390	2.13E-05
S100A8	S100 calcium binding protein A8	1971.1964	2.10E-10	3723.9712	2.04E-11
MNDA	myeloid cell nuclear differentiation antigen	1828.3826	6.59E-13	1954.7697	6.37E-13
TREM1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1	1464.7515	4.64E-15	47.6682	4.65E-07
OSM	oncostatin M	1447.1203	7.91E-16	28.4358	1.78E-06
RASSF2	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2	1389.6172	1.44E-12	1116.7022	4.16E-12
CD53	CD53 molecule	1381.5499	1.38E-10	482.8541	1.25E-08
LSP1	lymphocyte-specific protein 1	1227.6608	7.39E-13	1129.4665	1.22E-12
PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	1045.6944	3.06E-15	369.1208	5.61E-13
RGR	Ral-GDS related protein Rgr	883.3586	7.87E-13	150.1716	6.67E-09
CLEC4E	C-type lectin domain family 4, member E	795.8175	5.24E-14	527.1662	5.07E-13
CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3	795.7474	7.37E-07	1360.6733	1.38E-07
ARHGAP25	Rho GTPase activating protein 25	794.3425	8.60E-12	163.2185	2.10E-08
AMICA1	adhesion molecule, interacts with CXADR antigen 1	637.8954	1.79E-13	489.2033	8.26E-13
CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4	633.3697	7.94E-06	779.5360	4.52E-06
RGS18	regulator of G-protein signalling 18	597.9231	5.24E-14	112.3573	5.60E-10
LILRB2	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 2	595.2464	2.85E-12	324.6317	6.45E-11
TNFAIP6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	561.6270	3.57E-09	105.8914	6.42E-06
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	561.2721	3.12E-15	78.0103	3.20E-10
LCP2	lymphocyte cytosolic protein 2 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa)	500.7315	3.97E-07	118.6915	9.79E-05
FPRL1	formyl peptide receptor-like 1	459.9299	1.11E-13	73.5171	4.91E-09
ALOX5AP	arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	402.0044	5.66E-11	403.4513	6.04E-11
AIF1	allograft inflammatory factor 1	398.2936	8.07E-07	395.4959	9.56E-07

LRRK2	leucine-rich repeat kinase 2	391.2629	2.28E-15	51.2388	7.60E-10
BASP1	brain abundant, membrane attached signal protein 1	380.2051	1.32E-13	134.0098	5.35E-11
TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	379.9244	7.39E-15	202.4287	3.41E-13
PLEK	pleckstrin	367.5997	1.64E-08	308.9999	4.23E-08
FPR1	formyl peptide receptor 1	342.2651	7.91E-16	111.4114	3.42E-13
IL8	interleukin 8	331.7939	1.86E-09	365.0498	1.26E-09
LRMP	lymphoid-restricted membrane protein	328.1195	1.34E-10	35.1767	2.35E-05
PROK2	prokineticin 2	299.4715	3.48E-14	192.5691	5.44E-13
ITGB2	integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)	294.5503	2.37E-07	1247.6289	7.22E-10
EMR3	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 3	271.9861	2.59E-11	93.9611	1.13E-08
TYROBP	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	266.2608	2.30E-11	348.7423	5.87E-12
		265.9692	4.09E-15	244.9633	7.43E-15
WIPF1	WAS/WASL interacting protein family, member 1	264.6823	7.91E-16	44.9241	5.82E-11
FGR	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog	245.8516	1.52E-13	123.9769	1.04E-11
HCK	hemopoietic cell kinase	242.4607	2.08E-13	157.1428	3.13E-12
SIGLEC10	sialic acid binding Ig-like lectin 10	234.3396	1.62E-09	14.5344	0.003087
		221.3020	1.52E-13	192.9395	4.72E-13
LRRC25	leucine rich repeat containing 25	218.3812	5.66E-11	63.6656	8.21E-08
TRAF3IP3	TRAF3 interacting protein 3	216.0309	6.95E-10	136.3210	9.20E-09
IGSF6	immunoglobulin superfamily, member 6	212.5353	4.00E-10	88.4988	5.71E-08
GPR65	G protein-coupled receptor 65	212.3963	1.90E-15	17.1377	1.72E-07
LILRA2	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 2	211.8186	1.84E-15	64.8505	3.13E-12
FLI1	Friend leukemia virus integration 1	211.6440	1.32E-13	253.9669	5.53E-14

Tab. 3.24 zeigt die 50 am stärksten induzierten Gene der Probe A431 + Caa + HL-60. Tab 3.25 zeigt die reprimierten Gene dieser Probe.

Tab. 3.24: 50 am stärksten induzierte Gene der Probe A431 + *Candida albicans* + HL-60

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_Caa_HL60	pvalue_A431_Caa_HL60
HPR	haptoglobin-related protein	1672.4220	3.51E-13
HP	haptoglobin	595.3828	8.26E-13
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	594.1578	0.003759
MGST1	microsomal glutathione S-transferase 1	377.4415	5.20E-16
LPL	lipoprotein lipase	293.0336	7.30E-09
TESC	tescalcin	259.2680	8.13E-10
MPO	myeloperoxidase	112.8569	1.69E-05
MS4A3	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3 (hematopoietic cell-specific)	88.9631	1.48E-09
CACNA2D4	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 4	88.1415	1.30E-12
		87.9789	1.68E-08
BPI	bactericidal/permeability-increasing protein	85.4480	7.32E-15
EPB41L3	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3	84.7264	2.67E-13
NFATC1	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	77.1232	1.48E-05
SERPINB10	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 10	76.8279	1.95E-12
SLC27A2	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2	61.5893	2.19E-14
LAIR1	leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1	60.7851	6.37E-13
FAM112B	family with sequence similarity 112, member B	58.9237	6.61E-08
ATP8B4	ATPase, Class I, type 8B, member 4	56.7812	7.94E-13
PTPN7	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 7	48.4919	2.59E-06
SIGLECP3	sialic acid binding Ig-like lectin, pseudogene 3	45.2310	2.03E-06
ANXA6	annexin A6	44.7505	8.55E-13
VSIG4	V-set and immunoglobulin domain containing 4	40.2433	0.000181

RETN	resistin	38.1968	0.004124
		37.9790	5.20E-16
RNASE2	ribonuclease, RNase A family, 2 (liver, eosinophil-derived neurotoxin)	37.1751	6.11E-07
GRB10	growth factor receptor-bound protein 10	35.2793	4.81E-06
TARP	TCR gamma alternate reading frame protein	33.1364	7.45E-05
ELA2	elastase 2, neutrophil	30.6715	7.43E-15
CACNA2D3	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta 3 subunit	30.1465	1.79E-06
GPR34	G protein-coupled receptor 34	29.8565	9.39E-07
PLA2G7	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	28.7948	3.02E-05
CLEC5A	C-type lectin domain family 5, member A	28.7463	2.24E-12
LAIR1	leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1	28.4469	3.59E-12
CD33	CD33 molecule	28.2315	2.77E-07
PSTPIP2	proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2	28.0129	4.60E-07
COL23A1	collagen, type XXIII, alpha 1	26.4722	3.27E-17
COLEC12	collectin sub-family member 12	25.2858	1.02E-07
SNURF	SNRPN upstream reading frame	22.7117	1.78E-10
SNTB1	syntrophin, beta 1 (dystrophin-associated protein A1, 59kDa, basic component 1)	22.0970	8.94E-05
ORM2	orosomucoid 2	22.0415	2.24E-11
C20orf103	chromosome 20 open reading frame 103	20.9647	0.000384
SERPINB2	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	20.2337	6.59E-06
SUCNR1	succinate receptor 1	20.0420	8.02E-06
SNRPN	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N	19.9665	3.44E-12
UCP2	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	18.8492	4.02E-06
		18.7984	0.001469
CARD9	caspase recruitment domain family, member 9	17.5274	1.48E-14
MLC1	megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1	17.3844	3.40E-05
C10orf11	chromosome 10 open reading frame 11	16.7003	7.87E-06
ADRBK2	adrenergic, beta, receptor kinase 2	16.6687	2.68E-10

Tab. 3.25: 20 am stärksten reprimierte Gene der Probe A431 + *Candida albicans* + HL-60

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_ Caa_HL60	pvalue_A431_ Caa_HL60
IL12A	interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)	-3.4345	0.0086
INHBA	inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)	-3.1808	0.0031
		-3.1371	0.0098
FLJ37543	hypothetical protein FLJ37543	-2.9393	0.0047
FST	folistatin	-2.8818	0.0069
DST	dystonin	-2.7836	0.0032
LOC644596	hypothetical LOC644596	-2.4725	0.0052
DOK7	docking protein 7	-2.4170	0.0015
		-2.3332	0.0047
FZD4	frizzled homolog 4 (Drosophila)	-2.3073	0.0024
HIST1H3G	histone cluster 1, H3g	-2.2615	0.0098
NANOS1	nanos homolog 1 (Drosophila)	-2.2182	0.0080
		-2.2181	0.0052
IFNE1	interferon epsilon 1	-2.2174	0.0031
DEPDC7	DEP domain containing 7	-2.1638	0.0066
		-2.1623	0.0043
		-2.1305	8.98E-05
LOC645431	hypothetical protein LOC645431	-2.1294	1.44E-07
ADRA1B	adrenergic, alpha-1B-, receptor	-2.1065	0.0001
RIMS3	regulating synaptic membrane exocytosis 3	-2.0927	2.55E-07

Tab. 3.26 und Tab. 3.27 (im Anhang) zeigen die Gene die in beiden Proben A431 + Caa und A431 + Caa + HL-60 reguliert wurden.

Tab. 3.28 zeigt die Gene die in allen drei Proben A431 + Caa und A431 + Caa + PMN und A431 + Caa + HL-60 induziert waren. Tab. 3.29 (im Anhang) zeigt die reprimierten Gene.

Tab. 3.28: Induzierte Gene der Proben A431 + *Candida albicans* und A431 + *Candida albicans* + PMN + A431 und *Candida albicans* + HL-60

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_Caa	pvalue_A431_Caa	FC_A431_Caa_PMN	pvalue_A431_Caa_PMN	FC_A431_Caa_HL60	pvalue_A431_Caa_HL60
GAL3ST1	galactose-3-O-sulfotransferase 1	14.6755	4.57E-07	10.0984	1.08E-06	10.2950	1.03E-06
		14.6222	4.34E-08	9.3578	2.21E-07	9.4949	2.26E-07
		10.6015	5.73E-07	7.3824	1.97E-06	7.5300	1.79E-06
		10.5610	1.37E-06	7.1192	7.54E-06	7.4068	5.44E-06
TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial (venous malformations, multiple cutaneous and mucosal)	10.3127	2.87E-05	7.2000	9.59E-05	7.2698	9.61E-05
ASB2	ankyrin repeat and SOCS box-containing 2	9.8831	0.00811	8.5010	0.00409	22.0441	1.52E-05
EDN2	endothelin 2	9.1287	1.19E-05	7.5591	9.67E-06	6.7425	3.29E-05
ADM	adrenomedullin	8.4198	1.03E-07	9.1432	2.12E-09	8.3589	7.26E-09
		8.3177	1.27E-06	8.8299	5.19E-08	13.6272	4.42E-10
		8.2373	5.99E-05	4.3484	0.00276	4.6592	0.00174
		8.0167	0.00289	7.7172	0.00067	6.3124	0.00309
NDRG1	N-myc downstream regulated gene 1	7.5173	2.29E-06	7.6796	1.57E-07	7.7480	1.67E-07
GPR146	G protein-coupled receptor 146	7.0632	6.44E-08	6.0313	3.19E-08	6.1708	2.65E-08
EGLN3	egl nine homolog 3 (C. elegans)	6.9584	2.18E-09	6.3226	2.40E-10	6.5259	1.62E-10
ARID3A	AT rich interactive domain 3A (BRIGHT-like)	5.8146	5.21E-08	6.4960	4.80E-10	8.0927	1.95E-11
RASSF4	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 4	5.7406	2.56E-06	4.5066	6.99E-06	6.2119	9.66E-08
LRIG1	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1	5.0291	1.88E-08	4.7477	2.45E-09	3.8982	9.62E-08
ANKRD37	ankyrin repeat domain 37	4.9908	1.56E-06	3.6149	1.95E-05	3.8394	8.32E-06
PFKFB4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4	4.8952	1.04E-05	3.9635	2.42E-05	4.0460	1.96E-05
UBASH3A	ubiquitin associated and SH3 domain containing, A	4.7753	4.52E-05	8.0245	5.98E-09	3.6945	0.00018
GALNTL1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase-like 1	4.7424	0.00039	3.4143	0.00213	3.5467	0.00163
WISP1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	4.6646	2.56E-06	2.9784	0.00023	2.7156	0.00099
		4.5826	1.56E-07	3.4888	1.24E-06	3.3075	3.64E-06
KCTD11	potassium channel tetramerisation domain containing 11	4.4551	6.96E-05	3.4365	0.00028	3.1526	0.00094
		4.1995	0.00016	3.7202	0.00011	3.3772	0.00042
HIG2	hypoxia-inducible protein 2	4.0296	9.28E-11	3.3899	7.40E-11	3.4878	4.03E-11
PPFIA4	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 4	3.9540	0.00012	3.0359	0.00061	2.9813	0.00088
FOSL2	FOS-like antigen 2	3.7907	6.00E-07	4.2620	4.40E-09	4.1622	7.98E-09
C22orf36	chromosome 22 open reading frame 36	3.7547	5.84E-06	2.8750	6.89E-05	2.7772	0.00013
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	3.7190	3.26E-06	3.6496	4.54E-07	3.7249	3.75E-07
		3.6888	5.84E-06	9.9578	8.13E-14	4.2540	6.26E-08
C10orf10	chromosome 10 open reading frame 10	3.6739	0.00333	2.8865	0.00780	2.9011	0.00829
LINCR	likely ortholog of mouse lung-inducible Neutralized-related C3HC4 RING domain protein	3.6419	0.00023	2.5337	0.00445	2.5751	0.00408
		3.4852	0.00802	3.0083	0.00746	3.1548	0.00525
RASL12	RAS-like, family 12	3.4320	1.70E-05	2.4412	0.00069	2.4645	0.00067
DAPK2	death-associated protein kinase 2	3.4253	2.29E-05	3.4073	3.01E-06	2.9608	3.81E-05

TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	3.2724	0.00123	5.7704	5.88E-08	4.9339	6.78E-07
FLJ40722	hypothetical protein FLJ40722	3.2531	1.00E-08	2.7184	2.89E-08	2.5634	1.56E-07
		3.1803	0.00177	3.5534	6.93E-05	3.2225	0.00028
INSIG2	insulin induced gene 2	3.1191	7.16E-07	2.8929	2.95E-07	2.8143	6.45E-07
EFNA1	ephrin-A1	3.0867	0.00054	3.0507	9.97E-05	3.0930	8.86E-05
STC2	stanniocalcin 2	2.9347	9.79E-07	2.6017	1.33E-06	2.5850	1.77E-06
		2.8696	0.005736	2.7789	0.001797	2.9637	0.00089
ENO2	enolase 2 (gamma, neuronal)	2.8672	1.46E-07	2.6234	8.05E-08	2.5271	2.55E-07
FUT11	fucosyltransferase 11 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	2.8532	1.63E-10	2.7296	1.52E-11	2.5388	1.53E-10
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	2.8062	0.000626	2.7852	0.000112	2.6651	0.000251
		2.7797	0.000345	2.1215	0.004526	2.0450	0.008581
		2.7281	0.001137	2.5663	0.000492	2.2200	0.004931
SYDE1	synapse defective 1, Rho GTPase, homolog 1 (C. elegans)	2.7250	0.002500	2.9362	0.000143	2.9408	0.000149

Auch nach 6,5 h sind viele der Gene reguliert, die schon in den Tabellen der gemeinsam regulierten Gene nach 7 h und 9 h gezeigt wurden. Die Epithelzellen antworteten also mit einer reproduzierbaren Genregulation auf die Infektion.

Mit Hilfe der Genexpressionsdaten ließ sich ermitteln, welche Rezeptoren während der Infektion mit *C. albicans* in den Epithelzellen reguliert wurden.

In Abb. 3.21 sind die regulierten Gene für Oberflächenrezeptoren in den *C. albicans* infizierten Epithelzellen mit PMNs nach 6,5 h dargestellt und in Tab 3.30 sind die dazugehörigen fold change und p-values angegeben.

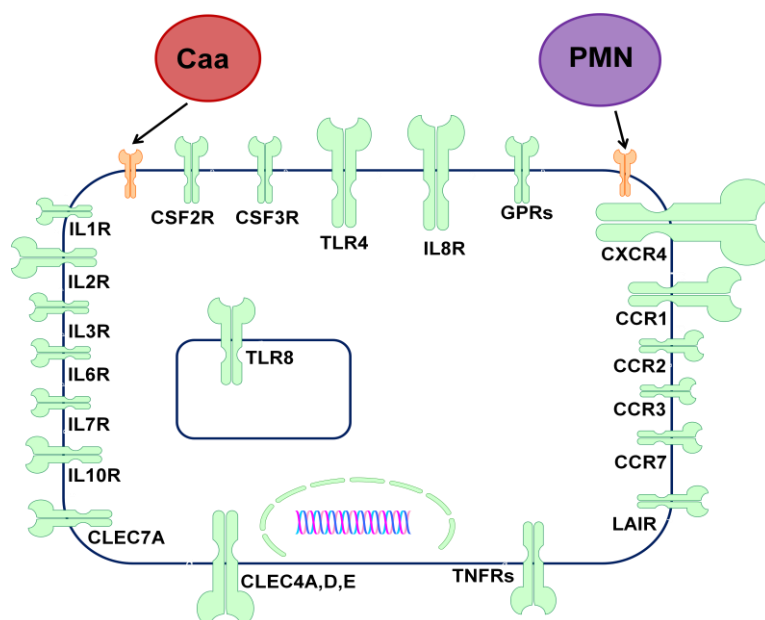


Abb. 3.21: Darstellung der regulierten Gene für Oberflächenrezeptoren

Dargestellt sind die signifikant regulierten Gene für Oberflächenrezeptoren in den mit *C. albicans* infizierten Epithelzellen nach 30 min Cokultivierung mit PMNs. Die dargestellte Größe der Rezeptoren korreliert mit der Menge an exprimiertem Gen

Das am stärksten regulierte Gen für einen Rezeptor, war das Gen für den CXCR4 Rezeptor, gefolgt von den Rezeptoren TNFR, CLEC4A und E, IL8R und den TLRs.

Die Regulation dieser Gene wurde allerdings nur in der Probe A431 + *C. albicans* + PMN und nur zum Teil in der Probe A431 + *C. albicans* + HL-60 beobachtet. In allen anderen Proben wurden diese Gene nicht reguliert. Die einzige Ausnahme war das Gen für den CXCR4 Rezeptor, welches auch in der Probe A431 + PMN mit einem fold change von 131,00 und einem p-value von 0,00097 reguliert wurde.

Aufgrund dieser Daten, sollten die Rezeptoren CXCR4, TLR4 und Dectin1 (CLEC7A) auf der Proteinebene mittels Durchflusszytometrie näher untersucht werden.

Tab. 3.30: Regulierte Gene für Oberflächenrezeptoren

Werte der fold changes und angepassten p-values der signifikant regulierten Gene für Oberflächenrezeptoren in den mit *C. albicans* infizierten Epithelzellen nach 30 min Cokultivierung mit PMNs oder HL-60.
n.D.: das Gen wurde nicht signifikant reguliert

	A431 + Caa + PMN		A431 + Caa + HL-60		
Gene Symbol	FC	p-value	FC	p-value	
CCR1	57.64	1.46E-07	72.41	4.38E-08	chemokine (C-C motif) receptor 1
CCR2	10.39	0.00634	98.86	3.55E-08	chemokine (C-C motif) receptor 2
CCR3	4.57	6.28E-08	n.D	n.D	chemokine (C-C motif) receptor 3
CCR7	17.92	3.87E-10	n.D	n.D	chemokine (C-C motif) receptor 7
CLEC12A	8.23	0.00455	65.04	1.24E-08	C-type lectin domain family 12, member A
CLEC2B	6.38	2.72E-05	n.D	n.D	C-type lectin domain family 2, member B
CLEC4A	115.49	8.23E-11	72.05	1.86E-09	C-type lectin domain family 4, member A
CLEC4D	50.06	1.49E-12	192.14	2.04E-16	C-type lectin domain family 4, member D
CLEC4E	795.82	5.24E-14	527.17	5.07E-13	C-type lectin domain family 4, member E
CLEC5A	n.D	n.D	28.75	2.24E-12	C-type lectin domain family 5, member A
CLEC7A	46.88	1.21E-05	32.03	9.28E-05	C-type lectin domain family 7, member A
CSF2RA	53.20	1.10E-08	28.69	8.48E-07	colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage)
CSF2RB	4.25	0.000611	2.67	0.04187	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)
CSF3R	127.02	3.05E-10	27.08	5.29E-06	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)
CX3CR1	15.82	9.88E-05	n.D	n.D	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1
CXCR4	10330.24	1.57E-13	1285.78	4.25E-10	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
IFNGR1	3.13	4.15E-07	1.99	0.00363	interferon gamma receptor 1
IFNGR2	2.14	0.00502	2.05	0.01010	interferon gamma receptor 2 (interferon gamma transducer 1)
IL10RA	13.20	3.87E-08	12.44	8.21E-08	interleukin 10 receptor, alpha
IL10RB	n.D	n.D	8.70	0.00659	interleukin 10 receptor, beta
IL1R2	11.58	8.94E-07	n.D	n.D	interleukin 1 receptor, type II
IL2RG	54.69	3.57E-09	6.00	0.01135	interleukin 2 receptor, gamma (severe combined immunodeficiency)
IL3RA	12.36	6.30E-08	n.D	n.D	interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)
IL6R	15.96	4.13E-09	9.94	5.64E-07	interleukin 6 receptor
IL7R	22.16	1.77E-07	n.D	n.D	interleukin 7 receptor

IL8RA	86.66	1.11E-14	n.D	n.D	interleukin 8 receptor, alpha
IL8RB	203.22	1.83E-14	4.69	0.01461	interleukin 8 receptor, beta
IL17RA	n.D	n.D	2.30	8.30E-06	interleukin 17 receptor A
TLR1	4.37	0.00303	n.D	n.D	toll-like receptor 1
TLR2	2.17	2.72E-05	n.D	n.D	toll-like receptor 2
TLR4	77.33	9.59E-14	19.98	6.92E-09	toll-like receptor 4
TLR6	3.06	0.019727	n.D	n.D	toll-like receptor 6
TLR8	51.88	8.90E-12	50.16	1.19E-11	toll-like receptor 8
TNFRSF19L	2.50	0.000102	2.62	4.57E-05	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19-like
TNFRSF1B	379.92	7.39E-15	202.43	3.41E-13	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
TNFRSF8	6.56	2.27E-05	2.85	0.04129	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8
TNFRSF9	4.16	0.011155	n.D	n.D	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9

In Abb. 3.22 sind die Zytokine und Chemokine dargestellt, deren Gene während der Infektion bei Anwesenheit der Immunzellen exprimiert wurden. Die Zahlenwerte sind in Tab. 3.31 aufgeführt.

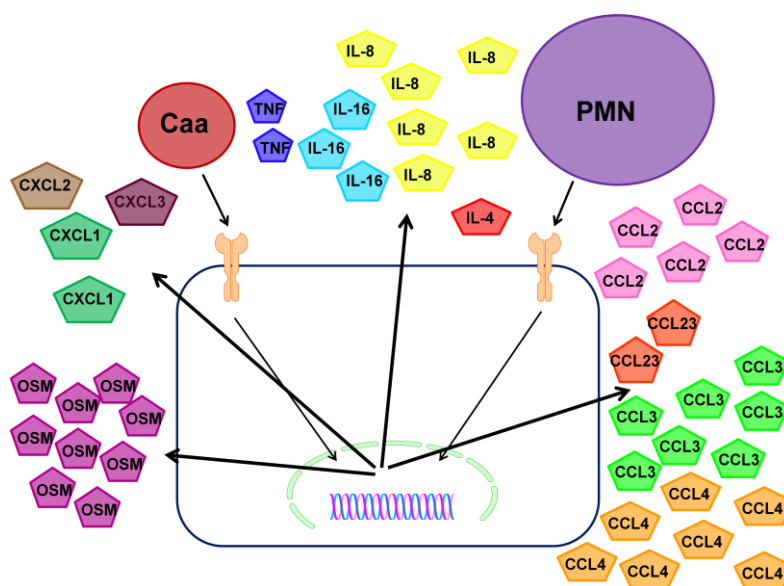


Abb. 3.22: Darstellung der regulierten Gene für Zytokine und Chemokine
Dargestellt sind die signifikant regulierten Gene für Oberflächenrezeptoren in den mit *C. albicans* infizierten Epithelzellen nach 30 min Cokultivierung mit PMNs. Die dargestellte Anzahl der Moleküle korreliert mit der Menge an exprimiertem Gen

Am höchsten war die Induktion des Gens für Oncostatin M (*OSM*). Das Zytokin Oncostatin M gehört zur IL-6 Zytokinfamilie und ist an der Steuerung der Hämatopoese beteiligt. Auch bei Entzündungsreaktionen spielt OSM eine Rolle [Guihard *et al.*, 2012]. Auch die Gene für CCL3, CCL4, CCL3 und IL-8 waren stark induziert.

Tab. 3.31: Regulierte Gene für Zytokine und Chemokine

Werte der fold changes und angepassten p-values der signifikant regulierten Gene für Zytokine und Chemokine in den mit *C. albicans* infizierten Epithelzellen nach 30 min Cokultivierung mit PMNs oder HL-60.

n.D.: das Gen wurde nicht signifikant reguliert

	A431 + Caa + PMN		A431 + Caa + HL-60		
Gene Symbol	FC	p-value	FC	p-value	
CCL2	n.D	n.D	594.16	0.0038	chemokine (C-C motif) ligand 2
CCL3	795.75	7.37E-07	1360.67	1.38E-07	chemokine (C-C motif) ligand 3
CCL3L3	125.98	1.37E-05	260.78	7.70E-07	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3
CCL4	633.37	7.94E-06	779.54	4.52E-06	chemokine (C-C motif) ligand 4
CCL7	n.D	n.D	8.48	8.14E-05	chemokine (C-C motif) ligand 7
CCL23	n.D	n.D	6.14	0.0069	chemokine (C-C motif) ligand 23
CXCL1	84.47	4.80E-10	n.D	n.D	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)
CXCL2	5.71	0.0002	n.D	n.D	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
CXCL3	3.07	0.0084	3.41	0.0035	chemokine (C-X-C motif) ligand 3
IL4	3.61	0.0009	n.D	n.D	interleukin 4
IL8	331.79	1.86E-09	365.05	1.26E-09	interleukin 8
IL16	121.01	1.26E-12	32.10	1.69E-08	interleukin 16 (lymphocyte chemoattractant factor)
OSM	1447.12	7.91E-16	28.44	1.78E-06	oncostatin M
TNF	4.16	0.0015	53.98	3.69E-14	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)

Antimikrobielle Peptide spielen bei der Infektionsabwehr eine große Rolle. Auch in den *C. albicans* infizierten A431 mit Immunzellen wurden Gene für antimikrobielle Peptide reguliert. Diese sind in Tab. 3.32 aufgeführt.

Tab. 3.32: Regulierte Gene für antimikrobielle Peptide

Werte der fold changes und angepassten p-values der signifikant regulierten Gene für antimikrobielle Peptide in den mit *C. albicans* infizierten Epithelzellen nach 30 min Cokultivierung mit PMNs oder HL-60.

n.D.: das Gen wurde nicht signifikant reguliert

	A431 + Caa + PMN		A431 + Caa + HL-60		
	FC	p-Value	FC	p-Value	
DEFA3	211.0081	0.000280	92.4907	0.00329	defensin, alpha 3, neutrophil-specific
DEFA4	15.2366	0.001945	n.D.	n.D.	defensin, alpha 4, corticostatin
CAMP	17.3760	2.43E-05	n.D.	n.D.	cathelicidin antimicrobial peptide
GNLY	16.8699	1.00E-05	n.D.	n.D.	granulysin
S100A8	1971.1964	2.10E-10	3723.9712	2.04E-11	Calgranulin-A

Da alle drei Zelltypen (A431, *C. albicans* und Immunzellen) ohne räumliche Trennung in einem Well inkubiert wurden, ist eine Kontamination der Epithelzell-RNA mit Immunzell-RNA nicht vollständig auszuschließen. Die am Boden des Wells adhärenen A431 wurden vor der RNA Isolation mehrmals mit 1 x PBS Puffer gewaschen, um die Neutrophilen zu entfernen.

In Tab. 3. 28 sind Gene zusammengestellt, die als Leukozyten-spezifisch bezeichnet werden und damit Hinweise auf eine mögliche Kontamination geben. Sie wurden vor allem in den Proben als signifikant exprimiert gefunden, in denen neben den Epithelzellen und Immunzellen auch *C. albicans* anwesend war. Die Co-Inkubation der Epithel- und Immunzellen alleine, führte nur bei maximal 5 der ausgewählten 13 Leukozyten-spezifischen Gene zu einer signifikanten Expression und die beobachteten Expressionsänderungen (fold changes) waren deutlich geringer als bei Anwesenheit von *C. albicans*. Darüber hinaus wurden 2 dieser 5 Gene auch in Proben ohne Immunzellen signifikant exprimiert, sie wurden also offensichtlich auch in Epithelzellen exprimiert. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass durch die von *C. albicans* gebildeten Hyphen die Immunzellen schlechter von den Epithelzellen entfernt werden konnten, so dass in diesen Proben mehr kontaminierte mRNA aus den Neutrophilen vorhanden war. Die endgültige Klärung dieser Fragen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr vorgenommen werden.

Einige dieser Gene sind auch in den Listen der 50 am stärksten regulierten Gene zu finden (Tab. 3.7, Tab. 3.13, Tab. 3.20, Tab. 3.22, Tab. 3.24). Diese Gene sind grün markiert.

Tab. 3.33: Leukozyten und Lymphozyten spezifische Gene

Gene nach 6,5 h, die auf eine Kontamination mit PMN oder HL-60 RNA hinweisen. Als signifikant reguliert gelten Gene, deren Intensitäten über 5 liegen.

Int.: gemessene, normalisierte und gemittelte Intensitäten der Microarray Messung; FC: fold change Werte; rot markiert sind die Intensitäten der signifikant regulierten Gene

Gene Symbol	GeneName	A431	A431_Caa			A431_Caa_PMN			A431_PMN			A431_Caa_HL60			A431_HL60		
		Int.	Int.	FC	p-value	Int.	FC	p-value	Int.	FC	p-value	Int.	FC	p-value	Int.	FC	p-value
LILRA2	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 2	1.04	1.08	1.03	1.0000	8.93	211.82	1.84E-15	4.44	9.55	0.0024	7.23	64.85	3.13E-12	2.19	2.12	1.0000
LAIR1	leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1	1.04	0.99	1.29	1.0000	2.87	3.09483	0.01511	0.99	-1.04	1.0000	7.13	60.79	6.37E-13	1.80	1.63	1.0000
SELL	selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)	1.14	1.14	1.01	1.0000	8.04	106.38	3.12E-15	2.47	2.37	1.0000	2.07	1.8494	0.41433	1.17	1.02	1.0000
LILRB2	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 2	1.27	2.19	1.83	1.0000	10.61	595.25	2.85E-12	5.26	14.20	0.0391	9.75	324.63	6.45E-11	4.95	11.48	0.1120
LILRA3	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (without TM domain), member 3	2.29	2.51	1.14	1.0000	7.57	36.36	6.14E-06	3.33	2.00	1.0000	6.38	15.93	0.0007	2.94	1.52	1.0000
LCP2	lymphocyte cytosolic protein 2 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa)	2.35	2.50	1.11	1.0000	11.38	500.73	3.97E-07	5.50	8.18	1.0000	9.34	118.69	9.79E-05	4.28	3.56	1.0000
LILRA5	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 5	2.62	2.26	1.00	1.0000	6.47	13.85	5.98E-05	2.87	-1.31	1.0000	7.14	22.08	2.58E-06	2.94	1.37	1.0000
LSP1	lymphocyte-specific protein 1	2.84	4.02	2.20	1.0000	13.11	1227.66	7.39E-13	7.50	23.93	0.0114	13.00	1129.47	1.22E-12	7.77	28.67	0.0064
EBI2	Epstein-Barr virus induced gene 2 (lymphocyte-specific G protein-coupled receptor)	3.10	3.54	1.35	1.0000	7.27	17.37	9.22E-05	3.43	1.25	1.0000	8.99	57.92	5.48E-08	4.16	2.06	1.0000
ITGAL	integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)	3.28	3.52	1.17	1.0000	6.74	10.37	1.09E-07	4.12	1.72	1.0000	7.67	19.84	1.66E-10	4.21	1.83	1.0000
LILRB3	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3	4.55	5.21	1.57	1.0000	11.56	132.53	5.19E-14	6.96	5.27	0.0741	9.56	32.37	1.54E-09	6.16	3.01	1.0000
LILRB4	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 4	4.62	5.27	1.57	0.9079	4.98	1.28	0.7221	4.59	-1.02	1.0000	4.87	1.19	0.87061	4.45	-1.12	1.0000
LCK	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	5.18	5.21	1.02	1.0000	6.33	2.20	0.0334	5.02	-1.12	1.0000	4.63	-1.45	0.49926	4.99	-1.14	1.0000

3.3.8 Abhängigkeit der Zytokin-Sekretion von der Zeit

Schaller *et al.* zeigten, dass orale Epithelzellen während einer Infektion mit *C. albicans* unter anderem die Zytokine IL-8, IL-1 α und TNF- α sekretierten [Schaller *et al.*, 2002]. Die Zytokine IL-6 und IL-10 werden hingegen von humanen PMNs sekretiert, wenn diese mit *C. albicans* infiziert worden waren [Fernandez & Lolis, 2002].

Um zu ermitteln, ob diese Zytokine auch in dem hier verwendeten Infektionsmodell sekretiert werden, wurden die Überstände einer *C. albicans* Infektion über einen Zeitraum von 21 Stunden analysiert. Dabei wurden die $5 \cdot 10^5$ Epithelzellen mit $5 \cdot 10^5$ SC5314 Hefezellen für 4 Stunden in RPMI⁺-Medium infiziert. Anschließend wurden $5 \cdot 10^6$ PMNs oder $2,86 \cdot 10^6$ HL-60 Zellen zu den infizierten Epithelzellen gegeben und die Zellen für weitere 4, 8, 14, 16 oder 21 Stunden inkubiert. Für jeden Zeitpunkt und jede Probe wurde ein eigenes Well der 24-Well-Platte verwendet. Die Zytokine der Überstände wurden wie in 2.2.9.1 beschrieben bestimmt. Für die Kulturen, bei denen keine hohen IL-8 Konzentrationen erwartet wurden (A431, A431 + *Candida*, A431 + PMN, A431 + HL-60, *Candida*, PMN, HL-60), wurden nur die Zeitwerte nach 14 und 16 Stunden bestimmt. Diese Werte sind als einzelne Punkte im Diagramm (Abb. 3.23) dargestellt.

In den Proben mit HL-60 Zellen wurden, wie in den vorherigen Versuchen (3.3.2 und 3.3.6) auch, die höchsten IL-8 Konzentrationen gemessen. Anhand der Grafik wird deutlich, dass der größte Teil des gemessenen IL-8 von den Immunzellen freigesetzt wurde, wenn diese einen direkten Kontakt zu *C. albicans* gehabt haben. Jedoch waren die IL-8 Konzentrationen für die Proben bei denen alle 3 Zellarten zusammen inkubiert wurden deutlich höher (im Vergleich: A431 + *Candida* + PMN mit *Candida* + PMN und A431 + *Candida* + HL-60 mit *Candida* + HL-60).

Es zeigte sich jedoch bei beiden Proben mit HL-60 Zellen (A431 + *Candida* + HL-60 und *Candida* + HL-60) ein Absinken der IL-8 Konzentrationen ab dem Zeitpunkt 14 Stunden. Möglicherweise wurde das IL-8 nach einer gewissen Zeit nicht mehr von den HL-60 Zellen gebildet und auch wieder abgebaut. Dieser Effekt lies sich bei den PMNs nicht beobachten. Hier nahmen die IL-8 Konzentrationen stetig zu.

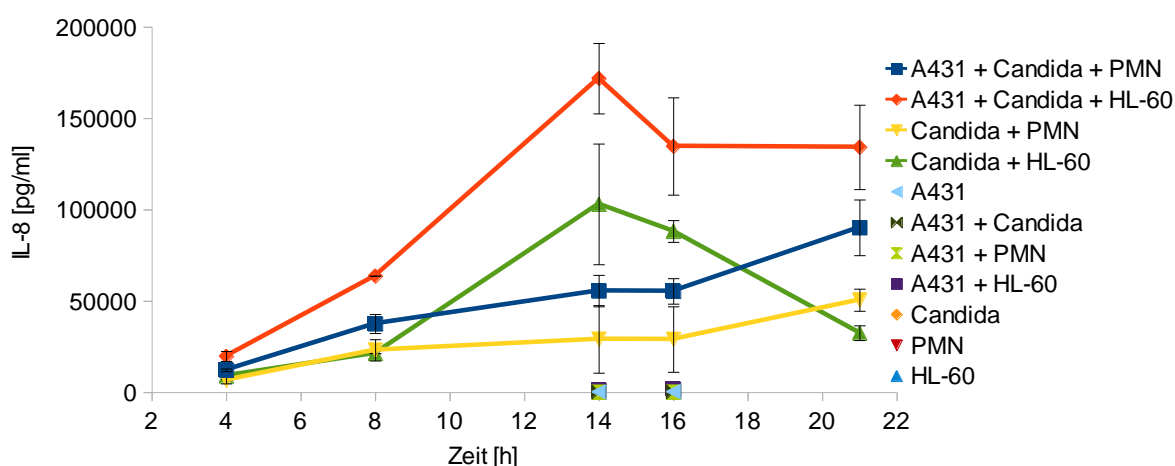


Abb. 3.23: IL-8 Konzentrationen zu verschiedenen Infektionszeitpunkten

Gemessen wurden die IL-8 Konzentrationen nach 4 Stunden Vorinfektion mit SC5314 und weiteren unterschiedlich langen Inkubationszeiten mit Immunzellen. Von den Kontrollen sind nur die 14 und 16 Stunden Werte als Punkte dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 2 oder 4 biologisch unabhängigen Replikaten.

In den Kontrollen wurden, wie erwartet, keine oder eine deutlich geringe IL-8 Konzentrationen als in den Überständen in Abb. 3.20 gemessen. Die A431 haben bei diesen Versuchen außergewöhnlich viel IL-8 sekretiert. Hierfür kann jedoch keine Erklärung gefunden werden. Die einzelnen Werte sind zur besseren Übersicht noch einmal in Tab. 3.34 dargestellt.

Tab. 3.34: IL-8 Konzentrationen der Kontrollen

Die Konzentrationen des Zytokins IL-8 nach 4 Stunden Infektion mit *C. albicans* und weiteren 14 und 16 Stunden mit Immunzellen. Die Konzentrationen sind in pg/ml angegeben

	14 h	16 h
A431	224,25	356,10
A431 + <i>Candida</i>	278,50	345,07
A431 + PMN	85,16	102,34
A431 + HL-60	1224,78	1829,09
<i>Candida</i>	0,00	0,00
PMN	40,24	37,98
HL-60	267,04	333,54

Bei der Analyse der Zytokine IL-6, TNF- α , IL-1 α und IL-10 wurde der Zeitpunkt 14 Stunden Inkubation mit Immunzellen nicht bestimmt. Die Überstände der Kontrollen wurden nur zum

Zeitpunkt 21 Stunden abgenommen. Das Zytokin Interleukin 6 konnte nur in den Proben A431 + *Candida* + PMN und *Candida* + PMN in signifikanten Konzentrationen nachgewiesen werden (Abb. 3.24). In den anderen Proben lagen die Werte unterhalb des Detektionslimits von 3,125 pg/ml. Die Werte der Proben A431 + *Candida* + HL-60 und A431 + *Candida* lagen „leicht“ über dem Detektionslimit. Es waren offenbar nur die PMNs in der Lage vermehrt IL-6 in den hier gemessenen Zeiträumen zu sekretieren, die A431 schienen dazu nur geringfügig in der Lage zu sein. Jedoch stieg auch bei IL-6 die sekretierte Menge stark an, wenn zu den infizierten A431 noch die PMNs kamen.

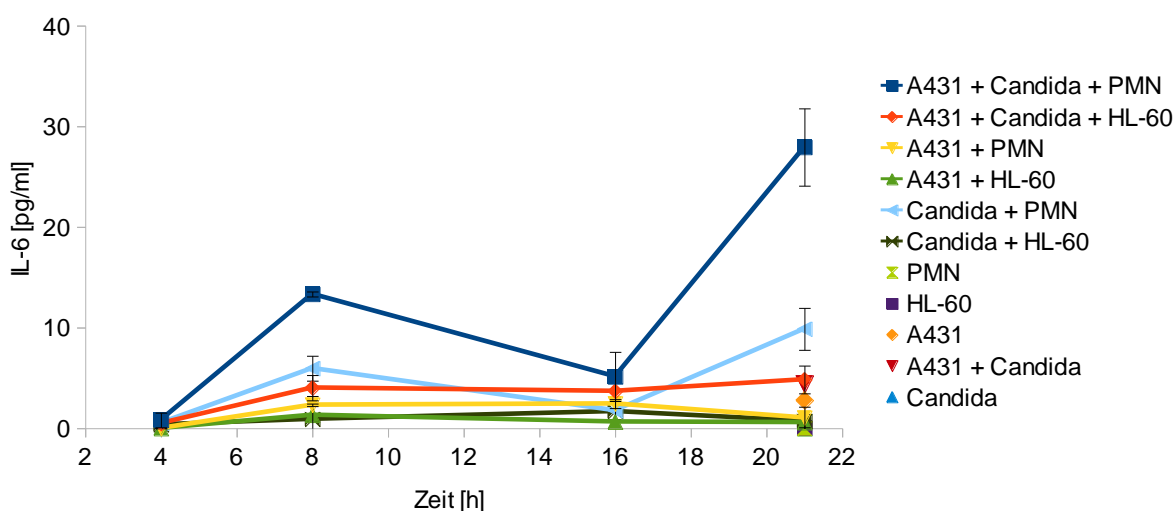


Abb. 3.24: IL-6 Konzentrationen zu verschiedenen Infektionszeitpunkten

Gemessen wurden die IL-6 Konzentrationen nach 4 Stunden Vorinfektion mit SC5314 und weiteren unterschiedlich langen Inkubationszeiten mit Immunzellen. Von den Kontrollen sind nur die 21 Stunden Werte als Punkte dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 2 biologisch unabhängigen Replikaten.

Das Zytokin TNF- α konnte nur in den Proben, in denen HL-60 Zellen enthalten waren, gemessen werden (Abb. 3.25). Auch hier war die gemessene Konzentration für die Probe, die alle 3 Zelltypen enthielt, am höchsten. Da auch die A431 + *Candida* Probe keine signifikante TNF- α Konzentration enthielt, schien das TNF- α ausschließlich von den HL-60 Zellen zu stammen. Die PMNs waren im Gegensatz zu den HL-60 Zellen nicht in der Lage TNF- α in den hier untersuchten Zeiträumen zu sekretieren.

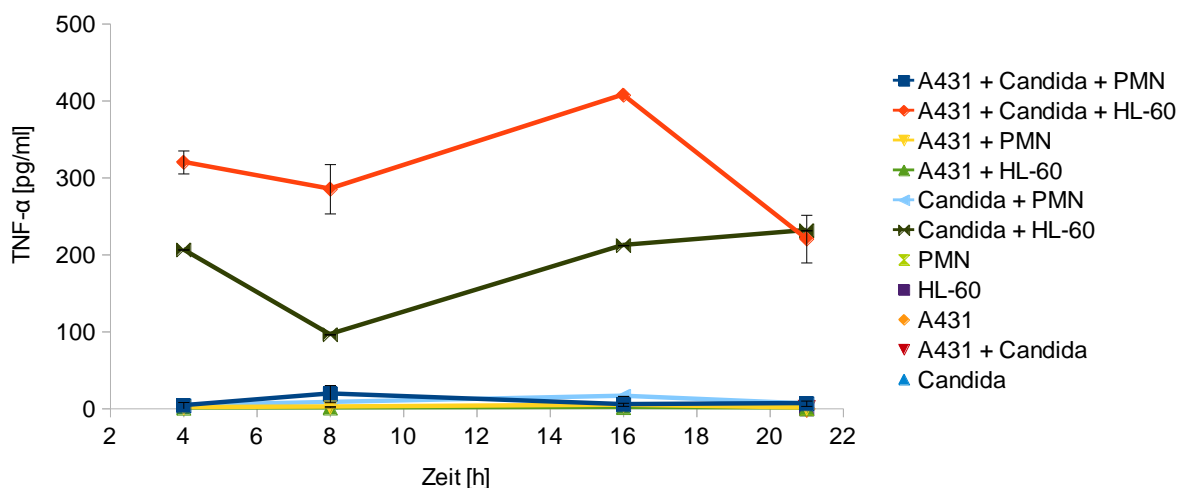


Abb. 3.25: TNF- α Konzentrationen zu verschiedenen Infektionszeitpunkten

Gemessen wurden die TNF- α Konzentrationen nach 4 Stunden Vorinfektion mit SC5314 und weiteren unterschiedlich langen Inkubationszeiten mit Immunzellen. Von den Kontrollen sind nur die 21 Stunden Werte als Punkte dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 2 biologisch unabhängigen Replikaten.

Das Zytokin IL-1 α (Abb. 3.26) wiederum schien auch von den A431 Zellen sekretiert zu werden. Die A431 Zellen alleine zeigten eine Grundexpression nach 21 Stunden von 16 pg/ml. Dieser Wert stieg während der Infektion mit *C. albicans* auf 66 pg/ml an. Jedoch waren auch die HL-60 Zellen in der Lage IL-1 α ins Medium abzugeben. Die Probe *Candida* + HL-60 zeigte deutlich höhere Werte an als die Probe A431 + *Candida* + HL-60. Die Probe *Candida* + PMN enthielt keine signifikante IL-1 α Konzentration, in der Probe A431 + *Candida* + PMN hingegen konnte IL-1 α analysiert werden. Hier stammte das IL-1 α wahrscheinlich von den A431 Zellen. Die PMNs haben kein IL-1 α produziert.

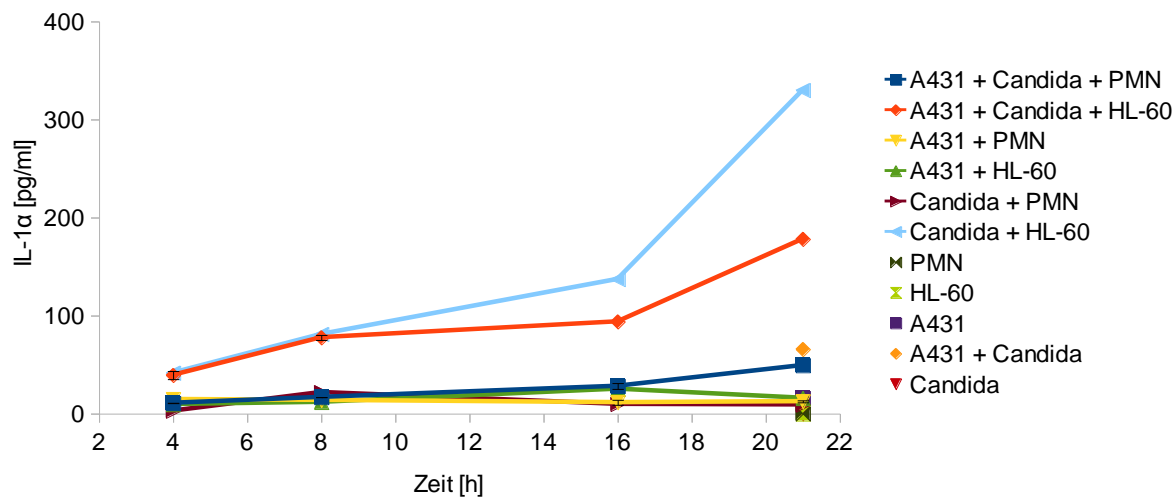


Abb. 3.26: IL-1α Konzentrationen zu verschiedenen Infektionszeitpunkten

Gemessen wurden die IL-1α Konzentrationen nach 4 Stunden Vorinfektion mit SC5314 und weiteren unterschiedlich langen Inkubationszeiten mit Immunzellen. Von den Kontrollen sind nur die 21 Stunden Werte als Punkte dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 2 biologisch unabhängigen Replikaten.

IL-10 konnte in keiner der analysierten Proben nachgewiesen werden.

3.3.9 Zytokin Analyse mittels Flow Cytomix Bead Assay

Mit Hilfe des *Bead Assay Flow Cytomix* sollten weitere Zytokine analysiert werden. 5×10^5 Epithelzellen wurden für 1 Stunde mit 5×10^5 *C. albicans* vorinfiziert und anschließend 12 Stunden mit den PMNs in einer 24-Well-Platte 2.2.7.2 inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und wie in 2.2.9.2 beschrieben analysiert. Untersucht wurden Überstände von: A431 alleine, A431 + *Candida*, A431 + *Candida* + PMN, A431 + *Candida* + HL-60, A431 + PMN, A431 + HL-60, *Candida* + PMN und *Candida* + HL-60.

Die Überstände wurden auf folgende Zytokine untersucht: IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12(p70), TNF-α, TNF-β, IFN-γ, IL-1α und G-CSF.

Von den Zytokinen konnte nur IL-8 in ausreichenden Konzentrationen reproduzierbar detektiert werden. Die anderen Zytokine waren entweder zu gering oder nicht reproduzierbar sekretiert worden (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.3.10 Färben von intrazellulärem Interleukin 8

Um zu ermitteln, von welchen Zellen das mittels ELISA (3.3.6) gemessene Interleukin 8 stammte, wurde das Zytokin intrazellulär mit spezifischen Antikörpern Fluoreszenz markiert.

3×10^5 A431 Zellen wurden wie in 2.2.12 kultiviert und am nächsten Tag für 1 Stunde mit 3×10^5 *C. albicans* infiziert. Anschließend wurden in jedes Kompartiment 0,5 µg/ml Brefeldin A zugegeben. Das Brefeldin A bewirkte eine Akkumulation der normalerweise sekretierten Proteine, so dass diese intrazellulär nachgewiesen werden konnten. Nachdem 3×10^6 PMNs (2.2.6) zugegeben wurden, wurden die Schalen mit den Zellen für weitere 6,5 Stunden oder 17 Stunden inkubiert. Die Proben, die weitere 17 Stunden inkubiert werden sollten, wurden nur mit 5×10^4 Hefezellen infiziert. Die Proben wurden wie in (2.2.12.3) beschrieben gewaschen und das Intrazelluläre IL-8 angefärbt. Intrazelluläres IL-8 wird durch die grüne Fluoreszenz des markierten spezifischen Antikörpers angezeigt. *C. albicans* wird durch die blaue Fluoreszenz sichtbar. Die Bilder der Färbungen sind auf der beigegeführten DVD gespeichert.

In Abb. 3.27 sind die Bilder der 6,5 Stunden Inkubation dargestellt. Bild A und Bild B zeigen jeweils nicht infizierte A431. In beiden Bildern sind nur wenige grün fluoreszierende Zellen zu erkennen.

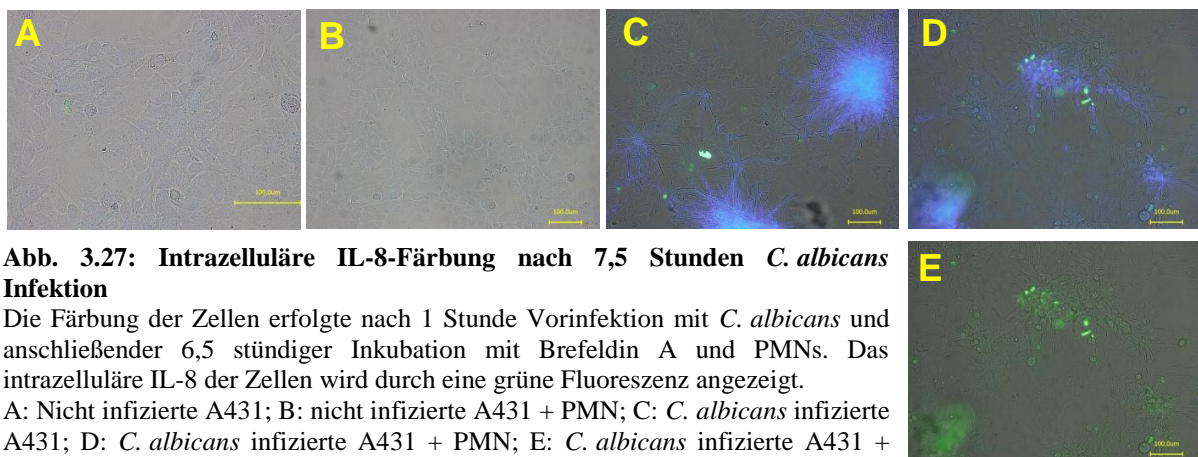


Abb. 3.27: Intrazelluläre IL-8-Färbung nach 7,5 Stunden *C. albicans* Infektion

Die Färbung der Zellen erfolgte nach 1 Stunde Vorinfektion mit *C. albicans* und anschließender 6,5 stündiger Inkubation mit Brefeldin A und PMNs. Das intrazelluläre IL-8 der Zellen wird durch eine grüne Fluoreszenz angezeigt.

A: Nicht infizierte A431; B: nicht infizierte A431 + PMN; C: *C. albicans* infizierte A431; D: *C. albicans* infizierte A431 + PMN; E: *C. albicans* infizierte A431 + PMN nur die Aufnahme mit dem Filter für die grüne Fluoreszenz ist gezeigt.

Bild C zeigt die mit *C. albicans* infizierten Epithelzellen. Hier sind mehrere fluoreszierende Zellen zu erkennen. Von diesen Zellen wurde Interleukin 8 gebildet und in den Zellen angereichert. In den Bildern D und E sind die mit *C. albicans* infizierten Epithelzellen mit PMNs zu erkennen. Die Bilder zeigen dieselbe Aufnahme, in Bild D sind sowohl *C. albicans* sichtbar wie auch das intrazelluläre IL-8. In Bild E ist das Overlay des Hellfelds und der grünen Fluoreszenz des IL-8 dargestellt. Anhand dieses Bildes ist zu erkennen, dass es sich bei den grün fluoreszierenden Zellen hauptsächlich um PMNs handelt. Die PMNs sind kleiner und runder als die Epithelzellen.

In Abb. 3. 28 sind die Bilder der 18 Stunden Inkubation gezeigt. Nach dieser längeren Inkubationszeit zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie nach 7,5 stündiger Inkubation. Die Bilder D und E zeigen zwei verschiedene Aufnahmen. Es ist zu erkennen, dass hauptsächlich die PMNs, die eine Hyphe phagozytiert haben, die grün fluoreszierenden Zellen darstellen.

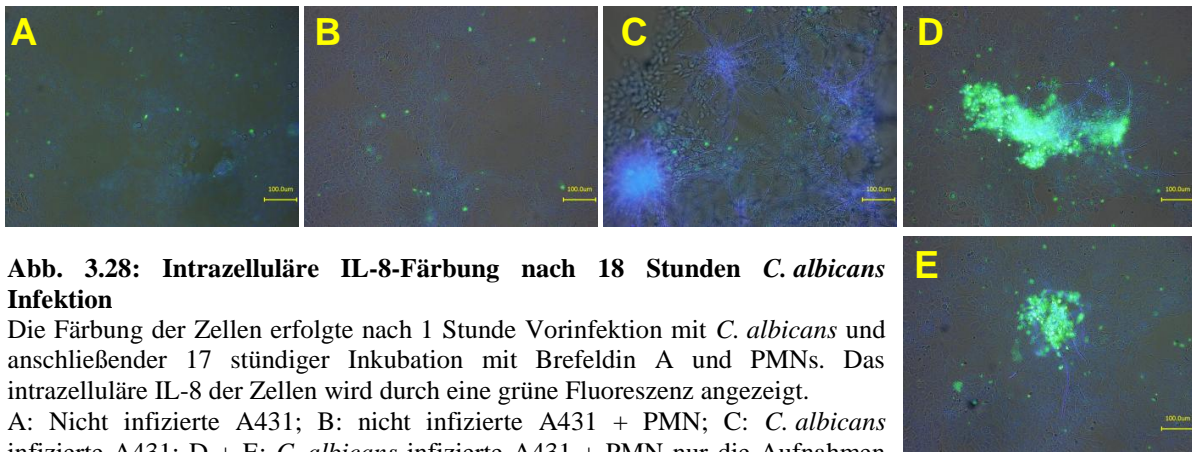


Abb. 3.28: Intrazelluläre IL-8-Färbung nach 18 Stunden *C. albicans* Infektion

Die Färbung der Zellen erfolgte nach 1 Stunde Vorinfektion mit *C. albicans* und anschließender 17 stündiger Inkubation mit Brefeldin A und PMNs. Das intrazelluläre IL-8 der Zellen wird durch eine grüne Fluoreszenz angezeigt.

A: Nicht infizierte A431; B: nicht infizierte A431 + PMN; C: *C. albicans* infizierte A431; D + E: *C. albicans* infizierte A431 + PMN nur die Aufnahmen

Unabhängig von den Zell-Kombinationen, die miteinander inkubiert wurden, konnte keine Zunahme der grünen Fluoreszenz in den A431 Zellen festgestellt werden. Die Genexpressionsdaten zeigten eine deutliche Induktion des *IL8* Gens in der Epithelzell RNA nach Inkubation von infizierten A431 mit PMNs. Dieses Ergebnis konnte mit diesem Versuch jedoch nicht bestätigt werden.

3.3.11 Einfluss von LL-37 auf die *C. albicans* Infektion

Tsai *et al.* haben gezeigt, dass die Zugabe von LL-37 zu *C. albicans* infizierten epidermoiden Zellen zu einer verringerten Adhäsion der Hefe an den Zellen führte [Tsai *et al.*, 2011].

Bei diesem Versuch sollten nun die Auswirkungen des antimikrobiellen Peptids LL-37 auf die *C. albicans* Infektion untersucht werden. Analysiert wurden die LDH und IL-8 Mengen in den Überständen von infizierten und nicht infizierten A431 Zellen nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von LL-37. $3 \cdot 10^5$ A431 Zellen wurden mit $3 \cdot 10^5$ *C. albicans* pro Well (MOI = 1) in RPMI-Medium infiziert (2.2.7.2). Zu den Proben wurden zwischen 0,05 und 50 µg/ml LL-37 (gelöst in sterilem MilliQ Wasser) gegeben. Die Zellen wurden 12 Stunden inkubiert, die Überstände abgenommen, zentrifugiert und die LDH- und IL-8 Konzentrationen bestimmt (2.2.8 und 2.2.9.1). Als Kontrolle dienten die Überstände von Epithelzellen, die zwar mit LL-37 behandelt wurden, denen aber keine *C. albicans* zugesetzt wurden.

In Abb. 3.24 sind die Ergebnisse der LDH Messung der Proben dargestellt.

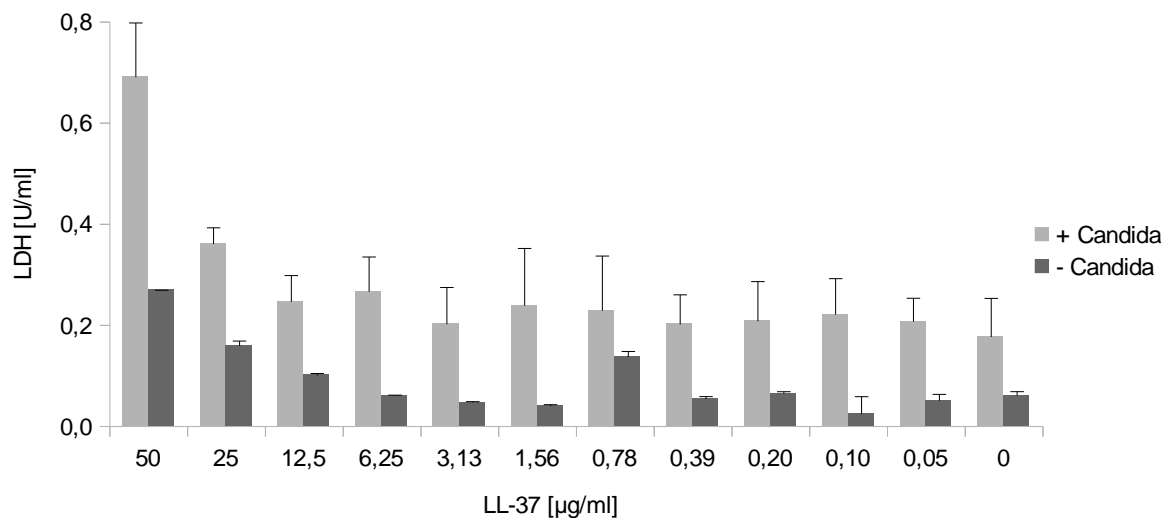


Abb. 3.29: LDH Konzentrationen nach einer *C. albicans* Infektion und LL-37 Behandlung

Gemessen wurden die LDH Konzentrationen in den Überständen von für 12 Stunden mit *Candida albicans* infizierten und nicht infizierten Epithelzellen und der Behandlung mit dem antimikrobiellen Peptid LL-37. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 2 biologisch unabhängigen Replikaten.

In der Abb. 3.29 ist zu erkennen, dass die durch *C. albicans* induzierte Zellschädigung der Epithelzellen durch die Behandlung mit 50 µg/ml LL-37 noch verstärkt wurde. Für diese Proben war ein deutlicher Anstieg der LDH Konzentration im Überstand zu verzeichnen. Es nahm jedoch auch die LDH Konzentration in den Überständen der nicht infizierten Vergleichsprobe zu. Offensichtlich hatte LL-37 in diesem Konzentrationsbereich an sich eine zellschädigende Wirkung auf die Epithelzellen. Für die infizierten und die nicht infizierten Proben mit 25 µg/ml LL-37 ließ sich auch eine leichte Erhöhung der LDH im Überstand erkennen. Dies kann aber nicht als signifikant betrachtet werden. Die Proben mit LL-37 Konzentrationen unterhalb von 25 µg/ml zeigten keinen Unterschied zu den Proben ohne LL-37.

Abb. 3. 30 zeigt die ermittelten IL-8 Konzentrationen. Hier ist nahezu der gleiche Effekt wie für die LDH Konzentrationen zu beobachten. Ab einer LL-37 Konzentration von 50 µg/ml stieg die Menge an freigesetzten IL-8 im Überstand stark an. Der Anstieg in der 25 µg/ml LL-37 Proben ist hier deutlicher ausgeprägt. Allerdings lässt sich kein Unterschied zwischen infizierter und nicht infizierter Probe feststellen. Die Proben, denen eine geringe Konzentration LL-37 zugegeben wurde, zeigten keinen signifikanten Unterschied zu den LL-37 Proben.

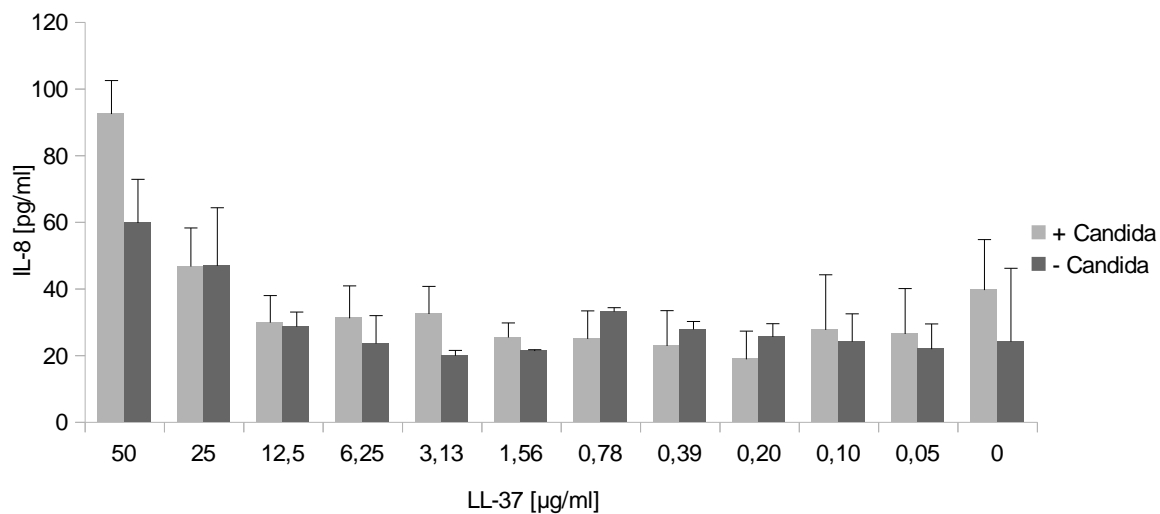


Abb. 3.30: IL-8 Konzentrationen nach einer *C. albicans* Infektion und LL-37 Behandlung

Gemessen wurden die IL-8 Konzentrationen in den Überständen von für 12 Stunden mit *Candida albicans* infizierten und nicht infizierten Epithelzellen und der Behandlung mit dem antimikrobiellen Peptid LL-37. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 2 biologisch unabhängigen Replikaten.

Die durch das LL-37 verursachte Zellschädigung konnte anhand der IL-8 Konzentrationen bestätigt werden. Die Sekretion von IL-8 ist zwar kein direktes Maß für die Zellschädigung, aber das Zytokin wird von den Epithelzellen gebildet um Immunzellen zu einem Infektionsherd zu rekrutieren. Eine erhöhte IL-8 Sekretion deutet also auf eine „Notsituation“ der Epithelzellen hin.

3.4 Analyse von A431 Oberflächenrezeptoren mittels Durchflusszytometrie

Aufgrund der Literatur- und Genexpressionsdaten sollte mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Expression der Oberflächenrezeptoren TLR2, TLR4, CLEC7A (Dectin1) und CXCR4 im Infektionsmodel mit direkten Epithel- und Immunzell Kontakt untersucht werden. Die Epithelzellen wurden wie in 2.2.10 beschrieben kultiviert und mit spezifischen Antikörpern markiert. Die Proben wurden wie in Tab. 3.35 in 6-Well-Platten angesetzt und anschließend analysiert. Die spezifischen Antikörper waren gegen jeweils ein Rezeptorprotein gerichtet. Der sekundäre Antikörper, der die spezifischen Antikörper markiert, war mit AlexaFluor488 gekoppelt. Dieser Farbstoff hat ein nahezu gleiches Emissions- und Extinktionsspektrum wie

das Fluorochrom FITC. Aus diesem Grund konnte die Fluoreszenz des sekundären Antikörpers mit dem im FACSCanto verbauten FITC-Filter bestimmt werden.

Die Kontrollen, bei denen keine Hefen oder Immunzellen zugegeben wurden, wurden in Bezug auf Inkubationszeiten und Medium Zugaben analog zu den restlichen Proben behandelt.

Tab. 3.35: Proben für die Durchflusszytometrie

Folgende Proben wurden auf die Oberflächenrezeptoren untersucht.

Probe	<i>C. albicans</i>	Immunzellen	Gesamt Inkubationszeit
A	Nein	Nein	7 Stunden
B	Ja	Nein	7 Stunden
C	Ja	PMN	7 Stunden
D	Ja	HL-60	7 Stunden
E	Nein	PMN	7 Stunden
F	Nein	HL-60	7 Stunden

Die Rezeptoranalyse wurde mit insgesamt 7 biologisch unabhängigen Replikaten durchgeführt. In Abb. 3.31 sind beispielhaft die Histogramme einer FACS Analyse dargestellt. Die Histogramme der restlichen Replikate zeigten ein ähnliches Bild wie die hier dargestellten.

Aus dem Histogramm der nicht infizierten A431 Zellen (Bild A) wird deutlich, dass keiner der Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen exprimiert wurde. Dies ist daran zu erkennen, dass die Fluoreszenzstärken der mit spezifischen Antikörpern markierten Proben nicht größer waren als die der Zellen, die nur mit dem sekundären Antikörper behandelt wurden (A431_Alexa488). Bild B zeigt das Histogramm der *C. albicans* infizierten A431. Hier ist eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzwerte für den CXCR4 Rezeptor zu erkennen. Das bedeutet, dass dieser Rezeptor auf der Oberfläche der Epithelzellen exprimiert wurde. Für die anderen Rezeptoren konnte keine vermehrte Expression festgestellt werden. Auch in Bild C und D (A431 + *C. albicans* + PMN und A431 + *C. albicans* + HL-60) ist die Expression des CXCR4 Rezeptors zu erkennen. In Bild C ist kein weiterer Rezeptor auf der Epithelzelloberfläche detektiert worden.

In den Histogrammen von den Proben, denen HL-60 zugegeben worden waren (Bild D und F) sieht man einen zweiten Peak für die Fluoreszenz des TLR2 und TLR4 Rezeptors. Dies deutet auf eine zweite Population an A431 Zellen hin, die diese Rezeptoren exprimierten. Das Auftreten dieser zweiten Population scheint aufgrund der Cokultivierung von A431 und HL-60 Zellen verursacht worden zu sein. Beide Proben in denen HL-60 Zellen kultiviert worden waren zeigten diesen Effekt. Die Anwesenheit von *C. albicans* schien dabei aber nicht von Bedeutung zu sein. Im Gegensatz dazu, schien die Expression des CXCR4 Rezeptors durch *C. albicans* vermittelt zu werden. Auf allen Epithelzellen, die mit *C. albicans* infiziert wurden, konnte dieser Rezeptor detektiert werden. Hierbei schienen allerdings die Immunzellen keine Rolle zu spielen. Der Dectin 1 Rezeptor konnte in keiner der Proben nachgewiesen werden.

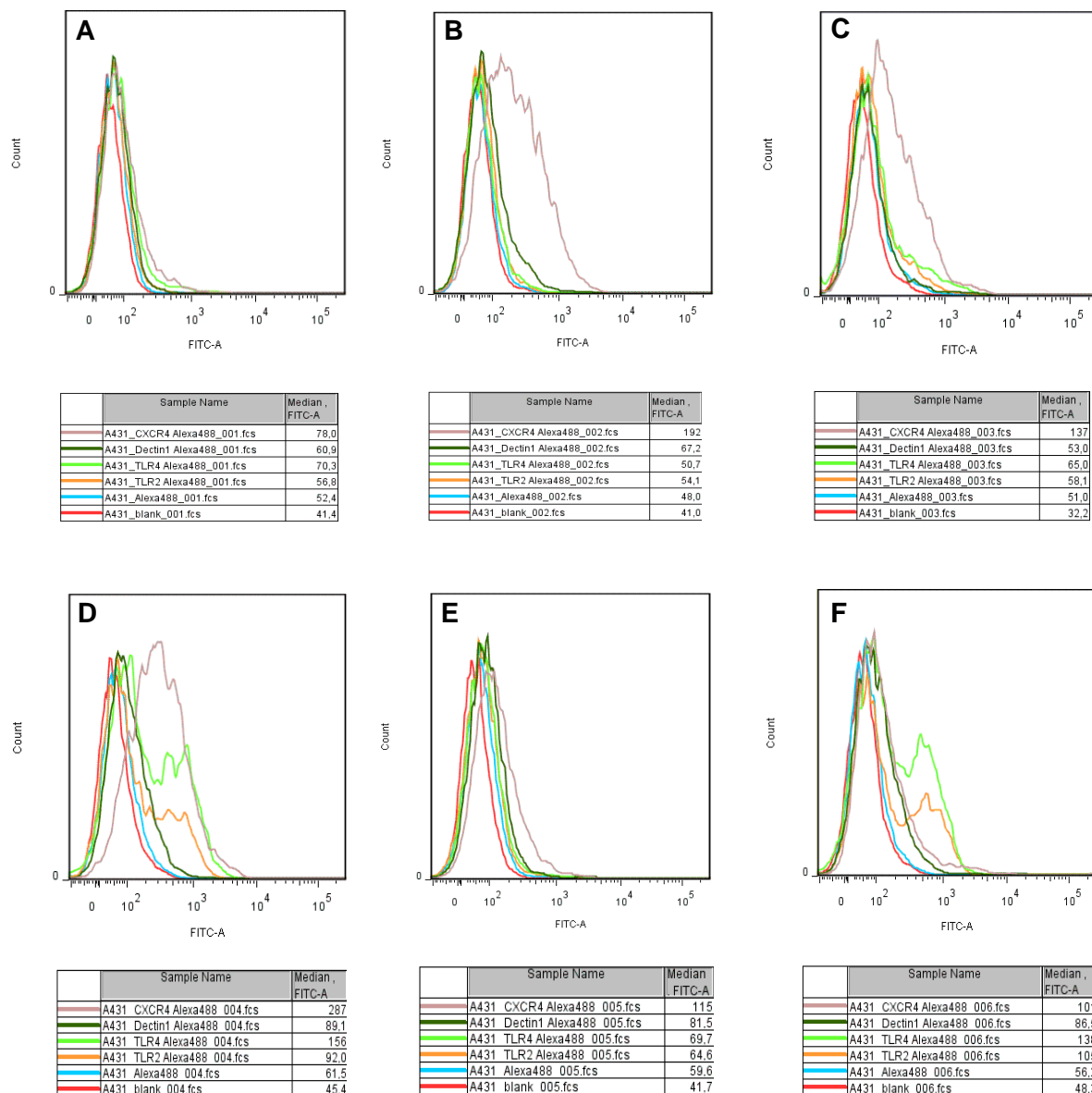


Abb. 3.31: Oberflächenrezeptorexpression nach der *C. albicans* Infektion mit und ohne Immunzellen
 Analysiert wurden die Rezeptoren für TLR2, TLR4, Dectin1 und CXCR4 nach 3 stündiger Vorinfektion mit *C. albicans* und anschließender 4 stündiger Inkubation mit Immunzellen.

A: Nicht infizierte A431; **B:** *C. albicans* infizierte A431; **C:** *C. albicans* infizierte A431 + PMN; **D:** *C. albicans* infizierte A431 + HL-60; **E:** nicht Infizierte A431 + PMN; **F:** nicht Infizierte A431 + HL-60.

A431 blank: ohne Antikörper; **A431 Alexa488:** nur mit sekundärem Antikörper; **A431 TLR2 Alexa488:** primärer TLR2 Antikörper und sekundärer Antikörper; **A431 TLR4 Alexa488:** primärer TLR4 Antikörper und sekundärer Antikörper; **A431 Dectin1 Alexa488:** primärer Dectin1 Antikörper und sekundärer Antikörper; **A431 CXCR4 Alexa488:** primärer CXCR4 Antikörper und sekundärer Antikörper

3.5 Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR

3.5.1 Vergleich zwischen Microarray und RT-PCR

Anhand der Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (*Real time PCR*, RT-PCR) sollte die Expression einiger Gene bestätigt werden. Analysiert wurden die Gene: *CCL2*, *CLEC4E*, *CLEC7A* (*Dectin1*), *CXCR1*, *CXCR4*, *IL10*, *IL1R2*, *IL6*, *IL8*, *TLR2*, *TLR4* und *TLR8* sowie die Housekeepergene *HPRT1*, *RPL13A* und *GAPDH*. Die ausgewählten Gene wurden entweder in der Literatur im Zusammenhang mit einer *Candida albicans* Infektion erwähnt, oder wurden bei den in dieser Arbeit untersuchten Microarrays als reguliert detektiert (3.3.7).

Die Housekeepergene dienen zur Normalisierung der Genexpressionsdaten. Diese Gene sollten in allen Proben, unabhängig von der Behandlung, in gleichem Maß exprimiert werden. Somit lassen sich Schwankungen in der eingesetzten RNA Menge und Messungenauigkeiten ausgleichen. Auch bei der RT-PCR müssen die Proben als Triplikate vermessen werden, um einen statistischen p-value ermitteln zu können.

Die Proben wurden wie in 2.2.11.2 beschrieben behandelt und vorbereitet.

Zunächst wurde überprüft, ob die Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR die gleichen Ergebnisse liefert wie die mittels Microarray. Dazu wurden die Proben A431 7 h, A431 + *Candida albicans* 7 h und A431 + *Candida albicans* + PMN 7 h, die schon mit den Microarray untersucht wurden (siehe Abschnitt 3.3.7), auch mit der RT-PCR analysiert. Auch hierbei diente die Probe A431 7 h ohne Infektion als Referenzprobe. Das Ergebnis ist in Tab. 3.36 dargestellt.

Tab. 3.36: RT-PCR Analyse der Proben nach 7 h *Candida* Infektion

Die Genexpressionsdaten, die mittels Microarray ermittelt wurden, sind den Ergebnissen, die mittels RT-PCR gemessen wurden gegenübergestellt. Analysiert wurden die Proben A431 7 h als Referenz, A431 + *Candida albicans* 7 h und A431 + *Candida albicans* + PMN 7 h aus Kapitel 3.3.7.

	Array				RT-PCR			
	p-value A431 + Caa	Fold change A431 + Caa	p-value A431 + Caa + PMN	Fold change A431 + Caa + PMN	p-value A431 + Caa	Fold change A431 + Caa	p-value A431 + Caa + PMN	Fold change A431 + Caa + PMN
CCL2	1.0000	1.61	0.3042	23.11	0.1779	-5.62	0.0027	-37.53
CLEC4E	1.0000	1.00	5.63E-15	1244.95	0.5588	1.57	0.0001	1557.48
CLEC7A	1.0000	-1.21	1.13E-09	30.52	0.0073	15.44	0.0004	20.99
CXCR4	1.0000	-1.00	3.89E-15	31785.19	0.5457	-2.34	0.0027	505.53
IL1R	1.0000	-1.10	0.0171	2.36	0.1992	-1.64	0.8746	-1.25
IL8	1.0000	2.69	1.26E-08	218.50	0.1382	7.36	0.0004	547.48
TLR2	1.0000	-1.14	1.04E-09	3.28	0.4774	1.27	0.0026	12.35
TLR4	1.0000	1.00	1.09E-14	102.49	0.4312	-3.76	0.4388	-1.30
TLR8	0.7248	1.01	2.75E-11	44.32	0.8040	-1.49	0.0005	2.79

Die hier untersuchten Gene waren bei der Analyse der Probe A431 + Caa + PMN 7 h mit Microarrays als induziert aufgefallen. Dies konnte vom Trend her durch die RT-PCR bestätigt werden, auch wenn die quantitativen Angaben voneinander abwichen.

Die Gene *IL1R* und *TLR4* wurden allerdings als nicht reguliert und das Gen *CCL2* als reprimiert analysiert. Dies entsprach nicht den mit Microarray ermittelten Werten. Zusätzlich wurde bei den RT-PCR Messungen noch eine Regulation des Gens *CLEC7A* (Dectin1 Rezeptor) bei den infizierten Epithelzellen ohne PMNs ermittelt, welches bei den Microarrays als nicht signifikant reguliert gemessen wurde.

3.5.2 Behandlung von A431 mit Infektionsüberständen

Während der Infektion der Epithelzellen mit Immunzellen werden lösliche Substanzen von den Epithelzellen, *C. albicans* und den PMNs ins Medium sekretiert. Um zu analysieren welchen Einfluss diese Substanzen auf die Epithelzellen haben, wurden Genexpressionsanalysen von Epithelzellen, die mit verschiedenen Infektionsüberständen behandelt wurden, angefertigt (2.2.7.4).

Die RT-PCR wurde nach 2.2.11.2 mit allen 12 vorhandenen Primerpaaren durchgeführt.

Die Ergebnisse der Analyse sind in Tab. 3.37 dargestellt.

Tab. 3.37: RT-PCR Analyse von A431 nach Behandlung mit Infektionsüberständen

Die Epithelzellen wurden mit Überständen von *C. albicans* infizierten PMN, nur PMN oder nur *C. albicans* behandelt. Die Überstände wurden 1:3 mit frischem RPMI⁺-Medium verdünnt und für 1,5 Stunden mit den A431 inkubiert.

Überstand PMN			Überstand Caa+PMN			Überstand Candida		
	p-value	Fold change		p-value	Fold change		p-value	Fold change
IL6	0.0001	226.8875	IL6	0.0303	254.0849	IL6	0.0033	403.5676
IL8	0.0222	2.1251	IL8	0.0497	2.5184	CXCR1	0.0385	-4.1989
IL1R	0.0258	13.1546	TLR4	0.0498	6.9123			

Bei allen Behandlungen wurde das Gen *IL-6* stark induziert. Die Expression des Gens *IL-8* wurde dagegen nicht induziert, wenn der Überstand einer reinen *Candida albicans*-Kultur verwendet wurde. In den Epithelzellen, die mit dem Überstand PMN behandelt wurden, wurde außerdem noch das Gen für den IL-1 Rezeptor (*IL1R*) induziert. Die Substanzen in dem Überstand der mit *C. albicans* infizierten PMNs sorgten zusätzlich noch für die Expression des Gens für den Toll-like Rezeptor 4. Die Regulation von *TLR4* wurde auch bei den Microarrays beobachtet. Die Regulation dieses Gens ist also nicht von einem direkten Zellkontakt abhängig, sondern wird über sekretierte Komponenten vermittelt. Das einzige reprimierte Gen findet sich in den Epithelzellen, die mit dem reinen *C. albicans* Überstand behandelt worden sind. Hier wurde das Gen *CXCR1* weniger exprimiert als in den Referenzproben.

4 DISKUSSION

C. albicans besiedelt als kommensaler Organismus Haut und Schleimhäute des Menschen, ohne Symptome hervorzurufen. Sind aber die Abwehrmechanismen des Menschen durch Alter, Krankheit oder immunsupprimierende Therapien geschwächt, kann sich der Hefepilz stark vermehren, die Hautschichten durchdringen und in die Blutbahnen gelangen. Der Hefepilz kann auch durch Wunden oder Katheter in den Körper geschleust werden. Einmal in der Blutbahn angelangt, verbreitet er sich im ganzen Körper und infiziert und überwächst die inneren Organe (systemische Kandidose), was meistens zum Tod des Patienten führt.

Ziel dieser Arbeit war, die Reaktionen von Epithelzellen auf die Anwesenheit von *C. albicans* auf molekularer Ebene zu analysieren. Insbesondere die Rolle des Immunsystems sollte genauer untersucht werden, da bei der kommensalen Kolonisation von Schleimhäuten kein unmittelbarer Kontakt zum Immunsystem gegeben ist. Genomweite Genexpressionsanalysen mit Hilfe von Microarrays lieferten dabei die umfassendsten Informationen. Allerdings können dadurch keine direkten Informationen über Signaltransduktionskaskaden, ausgehend von den PRRs zu den jeweiligen Transkriptionsfaktoren gewonnen werden. Ergänzt wurden diese Daten durch Analysen der Zellschädigung, sowie dem Nachweis ausgewählter Proteine.

4.1 Etablierung der *in vitro* Infektionsmodelle

Es wurden bereits verschiedene Mausmodelle für Infektionen durch *C. albicans* beschrieben, um zum Beispiel die Wirksamkeit potentieller Antimykotika oder Impfstrategien oder die Virulenz unterschiedlicher *C. albicans* – Stämme zu untersuchen [Taylor *et al.*, 2005; Clancy *et al.*, 2009; Szabo & MacCallum, 2011]. Sie erlauben auch Untersuchungen zur Bedeutung einzelner Zelltypen oder zum Zusammenwirken verschiedener immunologisch relevanter Signalmoleküle für den Erfolg einer Infektion im Gesamtorganismus. Allerdings sind experimentelle Bedingungen im Einzelnen nur sehr schlecht kontrollierbar. So kann zwar die Pathogen-Dosis, mit der ein Tier infiziert wird, bestimmt und variiert werden, aber die Exposition einzelner Organe oder das Verhältnis zur Zahl einzelner Immunzellen kann nicht modifiziert werden. Auch bei der Analyse der molekularen Antworten von Zellen ist die Komplexität des Gesamtsystems zu beachten. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Tatsache, dass Mauszellen anders auf eine Infektion mit *C. albicans* antworten als menschliche Zellen.

Darum ist es sinnvoll, für die Untersuchung von humanen *C. albicans* Infektionen auch humane Zellen zu verwenden.

Deshalb wurde in dieser Arbeit ein zellkulturbasiertes *in vitro* Infektionsmodell etabliert. Hiermit können, im Unterschied zu Tiermodellen, einzelne experimentelle Bedingungen unabhängig voneinander kontrolliert werden. In diesem Modell wurde insbesondere die Reaktion von Epithelzellen, als Repräsentanten für Schleimhäute, auf die Anwesenheit von *C. albicans* und Neutrophilen, als Vertreter des angeborenen Immunsystems, analysiert.

Als Epithelzellen wurde die vaginale A431 Epithelzelllinie und als Pathogen der sequenzierte *Candida albicans* – Stamm SC5314 eingesetzt. Die Neutrophilen waren zum einen primäre Neutrophile (PMN), die für jeden Versuch aus frischem menschlichem Blut isoliert wurden, und zum anderen die stabile promyeloische Krebszelllinie HL-60, die sich zu Neutrophil ähnlichen Zellen differenzieren lässt. Eine Änderung im Verhalten der PMNs konnte, aufgrund der verschiedenen Spender und auch der schwankenden Tagesform der einzelnen Spender, nicht ausgeschlossen werden. Durch den Einsatz der HL-60 Zellen konnten die Versuchsbedingungen weitestgehend konstant gehalten werden, da die Kultivierung im Labor immer den gleichen Bedingungen unterlag. Anhand dieses Infektionsmodells wurde die Kommunikation zwischen den Zellen zeitlich wie auch unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen untersucht.

Es wurden zwei verschiedene Zellkulturmodelle getestet. Mit dem Infektionsmodell ohne direkten Kontakt zwischen Epithel- und Immunzellen sollte die Wirkung der im Medium gelösten Substanzen untersucht werden, die bei der Infektion der Epithelzellen mit *C. albicans* eine Rolle spielen. Die Versuche mit den Zellkultureinsätzen erwiesen sich aber als nicht reproduzierbar und zum Teil als fragwürdig. Bei diesem Modell werden, wie bei Schaller *et al.* beschrieben, die Epithelzellen in dem Insert kultiviert und mit *C. albicans* infiziert [Schaller *et al.*, 2006]. Anschließend wird das Insert aus dem Medium entfernt und umgedreht in eine 6-Well-Platte gestellt. Der Zellkultureinsatz steht dabei umgedreht in 1 ml Medium und die Zellen „hängen“ in der Luft. Damit sie nicht austrocknen, werden die Zellen regelmäßig von der äußeren Membranseite aus mit Medium betropft. Auf diese Seite werden, wenn erforderlich, auch die Immunzellen gegeben. Die Immunzellen befinden sich also in einem Tropfen Medium, der auf der äußeren Membranseite liegt. Die löslichen Komponenten der Immunzellen werden mit dem Medium durch die Membran, durch die infizierte Epithelzellschicht in das Medium am Boden des Wells gespült und dort analysiert. Da das Medium jedoch nicht immer mit der gleichen Geschwindigkeit durch die Membran gesickert

war, kam es schon allein durch den Versuchsaufbau zu erheblichen Schwankungen. Die Medienzugaben reichten von 25 µl pro Stunde bis hin zu einer einmaligen Zugabe von 25 µl Medium in den gesamten 12 Stunden Inkubation. Dadurch ging die Vergleichbarkeit der Proben und der einzelnen Versuche untereinander verloren. Aus diesem Grund wurde dieses Infektionsmodell nicht weiter angewendet.

Das zweite *in vitro* Infektionsmodell erlaubte den direkten Kontakt zwischen Neutrophilen, Epithelzellen und *C. albicans*. Dabei wurden die Neutrophile direkt in das gleiche Well zu den *C. albicans* infizierten Epithelzellen gegeben.

Mit dem Modell ohne Kontakt zwischen Epithel- und Immunzellen konnten nur die Reaktionen untersucht werden, die durch die Substanzen, die die Immunzellen ins Medium sekretiert hatten, ausgelöst wurden. Mit dem Modell mit direktem Kontakt konnten zusätzlich auch die Antworten der Epithelzellen, die aufgrund des direkten Zellkontaktes zwischen Epithelzellen, *C. albicans* und Neutrophilen ausgelöst wurden, erfasst werden.

Zunächst wurde der geeignetste *Candida albicans* Stamm und das optimale Zellkulturmedium ausgewählt. Als Parameter für die Beurteilung des Infektionsverlaufs der Epithelzellen wurde die Zellschädigung anhand der LDH Konzentration im Überstand bestimmt. Das Enzym Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein intrazellulärer Bestandteil von tierischen Zellen. Werden die Zellen zerstört, gelangt das Enzym in den Überstand und kann dort mit einer Farbreaktion bestimmt werden, wobei die Menge an im Überstand enthaltener LDH direkt proportional zu der Menge an zerstörten Zellen ist. Verschiedene *Candida albicans* Wildtypstämme wurden in verschiedenen Zellkulturmedien auf ihre Fähigkeit zur Epithelzellschädigung hin untersucht. Getestet wurden die Stämme SC5314, DSM-1386 und DSM-1577 und die Zellkulturmedien RPMI und DMEM. Es zeigte sich, dass der Stamm SC5314 im RPMI-Medium die größte Zerstörung in der Epithelzellschicht verursacht hat. Die Stämme DSM-1386 und DSM-1577 zeigten eine geringere Zellschädigung. Dies lässt sich möglicherweise durch die verminderte Hyphenbildung dieser beiden Stämme erklären. Der phänotypische Wechsel vom Hefe- zum Hyphenwachstum ist ein seit längerem bekannter und gut untersuchter Virulenzfaktor von *C. albicans* [Calderone & Fonzi, 2001].

Auch die Wahl des Zellkulturmediums, in dem die Infektion durchgeführt wurde, scheint Auswirkungen auf die Infektionsfähigkeit von *C. albicans* und Zellschädigung zu haben. Dies könnte mit der unterschiedlichen Zusammensetzung der Medien erklärt werden. Ein

Unterschied in der Zusammensetzung der Medien ist Eisennitrat. In DMEM-Medium ist 0,248 μM Eisennitrat enthalten, in RPMI-Medium sind keine Eisenionen enthalten. Die Verfügbarkeit von Eisenionen soll ein wichtiger Faktor für die Infektionsfähigkeit von *C. albicans* sein [Almeida *et al.*, 2009]. Die Veränderung der Infektionseigenschaften wurde durch die Zugabe von 50 μM Eisen(III)chlorid (FeCl_3) zum RPMI-Medium getestet. Die Zugabe von Fe^{3+} Ionen ergab keine Erhöhung der LDH Konzentration - die LDH Konzentration nahm eher ab. Dies bestätigt den Effekt der unterschiedlich starken Epithelzellschädigung durch den Stamm SC5314 bei der Verwendung von RPMI- und DMEM-Medium. Das heißt, die Infektion ohne Eisenionen im Medium war gleich oder sogar noch effektiver als mit Eisenionen. Wenn im Medium keine frei verfügbaren Eisenionen vorhanden waren, musste der Pilz diesen essentiellen Nährstoff aus den Epithelzellen beziehen. Die Epithelzellen haben das Eisen, welches aus dem FBS stammt, intrazellulär durch das Protein Ferritin gespeichert [Almeida *et al.*, 2008]. Um an diese Ionen zu gelangen, musste *C. albicans* die Epithelzellen penetrieren. Wenn jedoch Eisenionen im Medium vorhanden waren, konnte die Hefe die frei verfügbaren Eisenionen aus dem Medium für sich nutzen.

Auch die *C. albicans* MOI schien einen Einfluss auf die Hyphenbildung und somit auf die Epithelzellschädigung gehabt zu haben. Es hat sich herausgestellt, dass die Infektion mit einer MOI = 2 die höchste Zellschädigung aufweist. Jedoch nimmt die LDH Konzentration ab einer MOI > 10 stark ab. Auch dieses Phänomen könnte mit der Hyphenbildung erklärt werden. Die Hefen haben ab dieser nur wenige kurze Hyphen ausgebildet, im Gegensatz zu den niedrigeren MOIs. Mögliche Erklärungen für das ausbleibende Hyphenwachstum könnten ein zu schneller Nährstoffverbrauch durch zu viele Hefen sein, sodass sie rasch in die stationäre Phase wechseln oder ein von *C. albicans* selbst unterdrücktes Hyphenwachstum durch Ausschüttung von Quorum Sensing Substanzen wie z.B. Farnesol aufgrund von zu hohen Zelldichten bei zu hohen MOIs [Enjalbert & Whiteway, 2005].

4.2 Infektionen mit direktem Kontakt zwischen Epithelzellen und Neutrophilen

4.2.1 Infektionsfilme

Werden die Epithelzellen mit *C. albicans* infiziert, ohne dass Neutrophile zugegeben werden, beginnt *C. albicans* bereits nach 20 Minuten Infektionszeit Hyphen auszubilden, welche in den weiteren 10 Stunden der Infektion die Epithelzellen überwachsen. Die Epithelzellen werden von dem Pilz aber nicht getötet, sie sind teilweise sogar noch in der Lage sich zu teilen (Film 1).

Werden aber Neutrophile zu der Infektion zugegeben, phagozytieren diese Neutrophile die *C. albicans* Hyphen und die Epithelzellen wurden auch nach 10 Stunden nicht überwachsen. Allerdings brechen die Hyphen nach etwa 8 Stunden wieder aus den Neutrophilen aus und beginnen wieder zu wachsen. Dies deckt sich mit den Beobachtungen beim Glukoseverbrauch.

4.2.2 Epithelzellschädigung während der *C. albicans* Infektion

Während der Zytotoxizitätsmessung mittels LDH-Assay wurden für die Proben, in denen FBS dem Medium zugegeben wurde, ungewöhnlich hohe LDH Konzentrationen ermittelt.

Die LDH-Bestimmung der Medien mit und ohne FBS ergab, dass die Blindwerte der Medien, die FBS enthielten, sehr hohe LDH Werte zeigten (falschpositiv). Daraufhin wurden RPMI-Medium, RPMI⁺-Medium (mit FBS) und DMEM-Medium auf ihre Grundabsorptionen während der LDH-Bestimmung untersucht. Es zeigte sich, dass das FBS einen hohen Hintergrund in der Messung verursachte. Dies kann damit erklärt werden, dass in dem FBS selbst LDH enthalten ist, welches dann im LDH-Assay detektiert wurde [Baba *et al.*, 2005].

In dem Modell mit direkten Kontakt zwischen den infizierten Epithelzellen und den Neutrophilen wurden alle Zellen in einem Well inkubiert. Die Immunzellen benötigen FBS im Medium, von daher musste hier RPMI-Medium mit FBS als Infektionsmedium verwendet werden. Dadurch war die Bestimmung der Epithelzellschädigung durch *C. albicans* mittels LDH-Assay in diesem Modell nicht möglich. Bei dem kontaktfreien Modell enthielt nur das Medium, mit dem die Neutrophilen auf der Rückseite der Zellkultureinsatzmembran „gefüttert“ wurden, FBS. Das Medium, welches in der 6-Well-Platte vorgelegt wurde, war serumfrei. Die Menge an FBS, welches durch das Füttern der Neutrophile mit dem RPMI⁺-Medium in das vorgelegte Medium in der 6-Well-Platte gelangte, reichte jedoch nicht aus um

die LDH Messung zu stören. Die bei diesen Versuchen ermittelten Hintergrundwerte zeigten keine zu hohen Absorptionen.

Die Epithelzellen, die mit *C. albicans* infiziert wurden, sekretierten geringe Mengen IL-8 als Antwort auf die Infektion [Dongari-Bagtzoglou & Kashleva, 2003]. Da bei den Genexpressionsanalysen das Gen für *IL8* nicht als reguliert identifiziert wurde, handelt es sich bei diesem IL-8 wahrscheinlich um intrazellulär gespeichertes IL-8, welches bei der Infektion der Epithelzellen ins Medium freigesetzt wurde. Das IL-8 wird von den Epithelzellen aufgrund einer Infektion sekretiert, um Immunzellen zu rekrutieren. Die IL-8 Antwort kann zwar nicht als Maß für die Zellschädigung herangezogen werden, aber dennoch kann daran der Erfolg einer Infektion beurteilt werden. Allerdings ist dies nur bei den Infektionen, denen keine Immunzellen zugegeben wurden, möglich. Die PMNs und HL-60 Zellen sekretieren auch IL-8 durch den Kontakt mit *C. albicans*, so dass die Vergleichbarkeit der Proben mit und ohne Immunzellen nicht gegeben ist, da nicht zu unterscheiden ist, welche Zellen wie viel IL-8 sekretiert haben.

In den Infektionsfilmen war zu erkennen, dass die Epithelzellen nicht durch die Infektion mit *C. albicans* getötet wurden. Anhand der Lebend/Tot-Färbungen konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Die Epithelzellen, auf denen *C. albicans* adhäriert war und Hyphen gebildet hatte, haben dadurch kaum Schaden erlitten. Nach 7,5 Stunden Infektionszeit waren in den Bereichen, in denen die Hefe gewachsen war nicht mehr tote Epithelzellen zu erkennen, als in den Bereichen in denen keine *C. albicans* adhäriert war.

Generell befanden sich in den infizierten Proben nur etwa 10 % mehr tote Epithelzellen als in den nicht infizierten. Die Epithelzellen in den Proben mit Neutrophilen glichen den nicht infizierten Zellen. Hier waren aufgrund von Phagozytose weniger Hyphen auf den Epithelzellen adhäriert. Ob die Neutrophile auch eine Schutzwirkung auf die Epithelzellen hatten, konnte mit diesem Versuch nicht ermittelt werden.

Nach 18 Stunden Infektionszeit waren etwa 50 % der Epithelzellen, die direkt unter den Hyphen lagen abgestorben. Allerdings waren die toten Zellen am Rand der Epithelzellschicht und die Epithelzellen hatten begonnen sich in diesem Bereich vom Boden abzulösen. Dieser Effekt trat nur bei den 18 stündigen Inkubationszeiten auf. In den Bereichen, die nicht am Rand lagen und in denen keine Hyphen adhäriert waren, waren keine toten Epithelzellen zu erkennen. Hier zeigte sich die gleiche Schutzwirkung durch die Neutrophilen, wie zuvor. Es waren weniger *C. albicans* Hyphen auf den Epithelzellen adhäriert als in den Proben ohne PMNs. Die Epithelzellen, die nicht unter den Hyphen lagen, waren vital.

4.2.3 Genexpressionsanalysen

Die Epithelzellen reagierten nur mit einer geringen Genexpression auf die Infektion mit *C. albicans*. Nach 9 Stunden Infektionszeit waren nur 70 Gene reguliert. Dies war die maximale Anzahl an regulierten Genen, die ermittelt wurde. Nach 1 h, 3 h, 6 h und 7 h waren weniger Gene reguliert worden als nach 9 h. Erst als die PMNs zu der Infektion zugegeben wurden, antworteten die Epithelzellen bereits nach 30 min mit einer stark regulierten Genexpression. Auch dies ist ein Hinweis darauf, dass die Epithelzellen vor allem eine Barrierefunktion gegenüber *C. albicans* haben. Würden die Epithelzellen bei jedem Kontakt mit *C. albicans* eine Entzündungsreaktion auslösen, würde dies, aufgrund der kommensalen Besiedlung, zu einer chronischen Entzündung im Körper führen, was sich für den Menschen negativ auswirken würde. Neutrophile kommen im Normalfall hauptsächlich im Blut vor. Erst bei einer Entzündungsreaktion werden sie zum Entzündungsherd rekrutiert und wandern in das Gewebe ein. Wenn ein Neutrophil in direkten Kontakt mit *C. albicans* kommt, ist entweder die Hefezelle in die Blutbahn gelangt oder der Neutrophil ist aufgrund einer bereits ausgelösten Entzündungsreaktion ins Gewebe eingewandert. Jetzt muss vom Immunsystem eine Entzündungsreaktion induziert werden, damit es zu keiner tödlichen systemischen Infektion kommt. Während dieser Immunantwort werden auch die Epithelzellen von den PMNs aktiviert, was sich dann in der vermehrten Geninduktion zeigt. Die Neutrophile aktivieren die Epithelzellen, woraufhin diese die inflammatorische Antwort verstärken und dadurch weitere Immunzellen rekrutieren. Ein Großteil der 70 Gene, die durch die Infektion mit *C. albicans* reguliert wurden, wurden auch in den infizierten Zellen mit Immunzellen reguliert. Dies zeigt, dass die Antwort der Epithelzellen auf die Infektion mit *C. albicans* weiterhin bestehen bleibt, auch wenn die Neutrophilen zugegeben wurden.

Bisher wurden keine Studien zu Ganzgenomanalysen von *C. albicans* infizierten vaginalen Epithelzellen im Zusammenhang mit Neutrophilen veröffentlicht. Es wurden nur vereinzelte Gene mittels RT-PCR in infizierten oralen Epithelzellen analysiert. *C. albicans* infizierte orale Epithelzellen zeigten nach 12 und 24 Stunden eine Regulation der Gene *IL1 α* , *IL1 β* , *IL8*, *TNF α* und *GM-CSF*. Allerdings wurden die Infektionen im Zellkulturmodell ohne direkten Kontakt von Epithel- und Immunzellen durchgeführt. Auch wurden dabei längere Infektionszeiten gewählt [Schaller *et al.*, 2004]. Wurden zu diesem Modell PMNs zugegeben wurde diese Regulation noch verstärkt. Außerdem konnte eine Regulation der Gene für die Toll-like Rezeptoren 2 und 4 beobachtet werden [Weindl *et al.*, 2007].

Auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionstudien wurden viele immunregulatorische Gene für Zytokine und Chemokine nach einer Infektion mit *C. albicans* in den Epithelzellen reguliert, wenn Neutrophile zu der Infektion zugegeben wurden. In den nur mit *C. albicans* infizierten Epithelzellen fand keine Regulation dieser Gene für Zytokine, Chemokine oder Rezeptoren statt. Einige Gene wurden aufgrund der hier ermittelten Daten und der Literatur ausgewählt und auf Proteinebene näher untersucht.

Schaller *et al.* zeigten, dass orale Epithelzellen während einer Infektion mit *C. albicans* im Zellkulturmodell ohne direkten Kontakt von Epithel- und Immunzellen unter anderem IL-8, IL-1 α , IL-1 β , TNF- α und G-CSF sekretierten [Schaller *et al.*, 2002]. Die Zytokine IL-6, IL-10, IL-12 und IFN- γ werden hingegen von humanen PMNs sekretiert, wenn diese mit *C. albicans* infiziert worden waren [Fernandez & Lolis, 2002; Netea *et al.*, 2006]. Auf Proteinebene konnte in dieser Arbeit allerdings nur das Chemokin IL-8 reproduzierbar in allen Proben einer *C. albicans* Infektion nachgewiesen werden. Das Zytokin IL-6 konnte nur nachgewiesen werden, wenn primäre Neutrophile mit den infizierten Epithelzellen inkubiert wurden. Die Zytokine TNF- α und IL-1 α konnten hingegen nur in den Proben nachgewiesen werden, in denen HL-60 Zellen mit *C. albicans* infiziert wurden.

Die Zytokine IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12(p70), TNF- β , IFN- γ , und G-CSF konnten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Die Färbungen des intrazellulären IL-8 zeigten nach 7,5 Stunden Infektionszeit nur vereinzelte Epithelzellen, die das Zytokin vermehrt gebildet und intrazellulär angereichert haben. Die Lage der Zellen zu den *C. albicans* Hyphen scheint aber keine Rolle zu spielen, es waren weder nur Zellen grün markiert, die in direktem Kontakt zur Hyphe standen, noch sind es nur die Zellen die keinen direkten Kontakt hatten [Dolowschiak *et al.*, 2010]. Es hatten hauptsächlich die PMNs, die Hyphen umschlossen hatten, intrazelluläres IL-8 angereichert. Dies zeigt, dass der Großteil an IL-8 das während der Infektionen detektiert wurde, von den Immunzellen sekretiert wurde. Auch nach 18 Stunden hatten die Epithelzellen kein IL-8 in den Zellen angereichert.

4.2.4 Einfluss von LL-37

In der Literatur wird eine Schutzwirkung des antimikrobiellen Peptids LL-37 auf Epithelzellen diskutiert [Tsai *et al.*, 2011], da LL-37 hemmt die Adhäsion von *C. albicans* an Zellen hemmen soll. Anhand des LDH Zytotoxizitätstest sollte untersucht werden, ob auch in

dem hier verwendeten Modell eine Schutzwirkung gegenüber den Epithelzellen besteht, wenn LL-37 zu den *C. albicans* infizierten Zellen gegeben wird. Es konnte jedoch keine Reduktion der LDH Konzentration nach LL-37 Zugabe festgestellt werden. Ab einer Konzentration von 25 µg/ml LL-37 wurden sogar zytotoxische Effekte durch das Peptid beobachtet. Es konnte auch keine Veränderung der IL-8 Sekretion festgestellt werden. Es zeigte sich eine erhöhte IL-8 Produktion ab einer LL-37 Konzentration von 25 µg/ml. Dies lässt zusätzlich auf eine Auslösung von Signalkaskaden durch die Wirkung des LL-37 auf die Epithelzellen schließen, da diese das Chemokin nur sekretieren, wenn sie Zellen des Immunsystems aufgrund einer Infektion oder Zellschädigung rekrutieren müssen.

4.3 Expression von Oberflächenrezeptoren

Die Rezeptoren TLR2, TLR4 und CLEC7A (Dectin1) sind für die molekularen Antworten der Epithelzellen bei einer Infektion mit *C. albicans* von Bedeutung [Netea *et al.*, 2006; Weindl *et al.*, 2007]. Aus den in dieser Arbeit ermittelten Genexpressionsdaten geht außerdem hervor, dass diese Rezeptoren auch in dem hier angewandten Infektionsmodell reguliert worden waren. Des Weiteren wurde auch der CXCR4 Rezeptor, nach der Zugabe von Immunzellen zu der Infektion, stark reguliert. Dieser Rezeptor ist möglicherweise auch in den Infektionsprozess involviert.

Die Expression der Oberflächenrezeptoren auf den Epithelzellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) analysiert. Die Zellen zeigten keine Grundexpression der Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Wenn jedoch die Zellen mit *C. albicans* behandelt wurden, zeigte sich eine starke Expression des CXCR4 Rezeptors und eine schwache Expression des Dectin1 Rezeptors. Die Epithelzellen, die mit *C. albicans* infiziert und zusätzlich mit den PMNs inkubiert wurden, zeigten außerdem eine Zunahme der Expression für die Rezeptoren TLR2 und TLR4. Diese Expressionen waren bei nicht infizierten A431 mit PMNs nicht zu erkennen. Die größten Unterschiede in der Expression sind in den Proben mit den HL-60 Zellen anhand des Auftretens eines zweiten Peaks zu erkennen. Dies deutet auf eine neue Population an A431 Zellen hin, die deutlich mehr TLR2- und TLR4 Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren. Es besteht aber weiterhin die Population mit geringer Rezeptorexpression. Auch bei diesen Proben lässt sich eine Zunahme des Dectin 1 (CLEC7A) Rezeptors erkennen.

Außer für den TLR2 Rezeptor wurden die Gene für die Rezeptoren in den Microarray Analysen als induziert detektiert. Die FACS Analyse bestätigte also die Microarray Daten.

4.4 Real Time PCR

Die Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR konnte die Analyse der Genexpression mit den Microarrays weitestgehend bestätigen. Lediglich zwei Gene wurden bei der Analyse mit der RT-PCR als nicht reguliert angezeigt und ein Gen wurde zusätzlich als reguliert angezeigt. Bei einer RT-PCR müssen für jede Probe und jedes Gen separate Reaktionsansätze pipettiert werden. Dadurch ist diese Methode stärker fehlerbehaftet als die Microarray Technik, bei der nur einmal die Probe pipettiert werden muss und die Sonden bereits am Chip angebracht sind. Die RT-PCR ist aber weitaus kostengünstiger wenn nur wenige Gene analysiert werden sollen.

Die Genexpressionsanalyse der überstandbehandelten Epithelzellen zeigte eine starke *IL6* Expression, die bei den bisherigen Genexpressionsanalysen nicht angezeigt wurde. Bei diesem Versuch wurden die Überstände aus einer 21 stündigen Inkubationszeit der PMNs und *C. albicans* gewonnen. Möglicherweise werden zu diesem späten Zeitpunkt lösliche Komponenten von den PMNs und Hefezellen sekretiert, die die Epithelzellen zur *IL6* Expression anregen. Bei den kürzeren Infektionszeiten für die Ganz-Genom-Arrays waren diese wahrscheinlich noch nicht vorhanden. Die Proben, in denen PMNs inkubiert wurden, haben auch eine leichte Induktion der *IL8* Expression ausgelöst.

Der Überstand der *C. albicans* infizierten PMNs induzierte zudem noch die Regulation des TLR4 Rezeptors. Dieser Rezeptor war auch in den mit Microarrays analysierten Proben als reguliert beobachtet worden. Diese Regulation scheint also durch lösliche Substanzen ausgelöst zu werden und ist vom Kontakt zwischen den infizierten Epithel- und Immunzellen unabhängig. Dies deckt sich mit den Aussagen von Weindl *et al.*. Der IL-1 Rezeptor (*IL1R*) wurde nur bei den mit dem PMN Überstand behandelten Proben reguliert. In den Microarray Daten hingegen wurde dieser Rezeptor nur als reguliert angezeigt, wenn Epithelzellen, *C. albicans* und PMN zusammen inkubiert wurden. In den mit dem *C. albicans* Überstand behandelten Proben wurde das Gen *CXCR1* reprimiert. Eine Regulation dieses Rezeptors war zuvor noch nicht festgestellt worden.

4.5 Fazit und Ausblick

Das Infektionsmodell mit direktem Kontakt zwischen Epithelzellen, *C. albicans* und Neutrophilen konnte erfolgreich etabliert werden. Mit diesem Modell konnten intra- und extrazelluläre Zytokine und Chemokine, Rezeptoren bestimmt und Genexpressionsstudien angefertigt werden. Das Modell zeigte eine relativ gute Reproduzierbarkeit im Hinblick auf die Zellschädigung und die IL-8 Sekretion. Die Analyse der Genexpressionsdaten brachte einige interessante Hinweise auf weitere in den Infektionsabwehrprozess involvierte Proteine, wie G-Protein gekoppelte Rezeptoren oder S-100 Proteine, hervor. Diese konnten aber in dieser Arbeit nicht näher untersucht werden. In dieser Arbeit wurden nur einige wenige Zytokine und Rezeptoren auf ihre Sekretion/Expression hin untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Zytokine IL-8, IL-6, TNF- α und IL-1 α während der Infektion, in Abhängigkeit von den eingesetzten Immunzellen, sekretiert wurden. Auch die Expression von TLR2, TLR4 und CXCR4 konnte im Zusammenhang mit der Infektion auf der Epithelzelloberfläche nachgewiesen werden. TLR2 und TLR4 wurden allerdings nur exprimiert, wenn HL-60 Zellen als Vertreter des Immunsystems verwendet wurden.

Die Epithelzellen antworteten nur mit einer sehr schwachen IL-8 Sekretion auf eine Infektion mit *Candida albicans*. Auch die Anzahl an regulierten Genen war äußerst gering. Erst als die Epithelzellen von den Neutrophilen „aktiviert“ wurden, zeigten sie eine Regulation einer Vielzahl von Genen und exprimierten Zytokine, Chemokine und Rezeptoren.

Dies ist ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen, da nicht die Epithelzellen alleine dafür verantwortlich sind den Pilz im kommensalen Zustand zu halten, sondern die Anwesenheit eines intakten Immunsystems essentiell ist. Bei der Suche nach geeigneten Pharmazeutika könnte man sich diese Tatsache zu nutzen machen, indem man nicht nur nach Wirkstoffen sucht die den Pilz schädigen, sondern auch nach Wirkstoffen, die das Immunsystem soweit stärken und aktivieren, dass der Pilz wieder in den kommensalen Zustand zurückgedrängt wird.[Almeida *et al.*, 2008].

5 Literatur

- Almeida, R. S., Brunke, S., Albrecht, A., Thewes, S., Laue, M., *et al.* (2008): The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS Pathog* **4** (11), e1000217.
- Almeida, R. S., Wilson, D. and Hube, B. (2009): *Candida albicans* iron acquisition within the host. *FEMS Yeast Res* **9** (7), 1000-12.
- Baba, C., Yanagida, K., Kanzaki, T. and Baba, M. (2005): Colorimetric lactate dehydrogenase (LDH) assay for evaluation of antiviral activity against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in vitro. *Antivir Chem Chemother* **16** (1), 33-9.
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1993): Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J.R. Statist. Soc. B* **57** (1), 289 - 300.
- Bennett, R. J. and Johnson, A. D. (2003): Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *Embo J* **22** (10), 2505-15.
- Bennett, R. J. and Johnson, A. D. (2005): Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu Rev Microbiol* **59**, 233-55.
- Bowdish, D. M., Davidson, D. J., Lau, Y. E., Lee, K., Scott, M. G., *et al.* (2005): Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J Leukoc Biol* **77** (4), 451-9.
- Bowdish, D. M., Davidson, D. J., Speert, D. P. and Hancock, R. E. (2004): The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes. *J Immunol* **172** (6), 3758-65.
- Breitman, T. R., Selonick, S. E. and Collins, S. J. (1980): Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77** (5), 2936-40.
- Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F., Santos, M. A., Sakthikumar, S., *et al.* (2009): Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* **459** (7247), 657-62.
- Calderone, R. A. (2002): *Candida and Candidiasis*. ASM Press, Washington, DC.
- Calderone, R. A. and Braun, P. C. (1991): Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* **55** (1), 1-20.
- Calderone, R. A. and Fonzi, W. A. (2001): Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9** (7), 327-35.

- Cambi, A., Gijzen, K., de Vries, J. M., Torensma, R., Joosten, B., *et al.* (2003): The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol* **33** (2), 532-8.
- Cassone, A. (1989): Cell wall of *Candida albicans*: its functions and its impact on the host. *Curr Top Med Mycol* **3**, 248-314.
- Chaffin, W. L., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D. and Martinez, J. P. (1998): Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62** (1), 130-80.
- Clancy, C. J., Cheng, S. and Nguyen, M. H. (2009): Animal models of candidiasis. *Methods Mol Biol* **499**, 65-76.
- Collins, S. J., Gallo, R. C. and Gallagher, R. E. (1977): Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* **270** (5635), 347-9.
- Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E. and Gallo, R. C. (1978): Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75** (5), 2458-62.
- Conti, H. R., Shen, F., Nayyar, N., Stocum, E., Sun, J. N., *et al.* (2009): Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* **206** (2), 299-311.
- Dalle, F., Wachtler, B., L'Ollivier, C., Holland, G., Bannert, N., *et al.* (2009): Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol*.
- Dalle, F., Wachtler, B., L'Ollivier, C., Holland, G., Bannert, N., *et al.* (2010): Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol* **12** (2), 248-71.
- De Luca, A., Zelante, T., D'Angelo, C., Zagarella, S., Fallarino, F., *et al.* (2010): IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. *Mucosal Immunol* **3** (4), 361-73.
- Deng, A., Chen, S., Li, Q., Lyu, S. C., Clayberger, C., *et al.* (2005): Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. *J Immunol* **174** (9), 5243-8.
- Dolowschiak, T., Chassin, C., Ben Mkaddem, S., Fuchs, T. M., Weiss, S., *et al.* (2010): Potentiation of epithelial innate host responses by intercellular communication. *PLoS Pathog* **6** (11), e1001194.

- Dongari-Bagtzoglou, A. and Kashleva, H. (2003): Candida albicans triggers interleukin-8 secretion by oral epithelial cells. *Microb Pathog* **34** (4), 169-77.
- Enjalbert, B. and Whiteway, M. (2005): Release from quorum-sensing molecules triggers hyphal formation during Candida albicans resumption of growth. *Eukaryot Cell* **4** (7), 1203-10.
- Ermert, D., Zychlinsky, A. and Urban, C. (2009): Fungal and bacterial killing by neutrophils. *Methods Mol Biol* **470**, 293-312.
- Escribese, M. M., Rodriguez-Garcia, M., Sperling, R., Engel, S. M., Gallart, T., *et al.* (2011): Alpha-defensins 1-3 release by dendritic cells is reduced by estrogen. *Reprod Biol Endocrinol* **9**, 118.
- Fernandez, E. J. and Lolis, E. (2002): Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**, 469-99.
- Fidel, P. L., Jr. (2007): History and update on host defense against vaginal candidiasis. *Am J Reprod Immunol* **57** (1), 2-12.
- Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., *et al.* (1979): Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* **54** (3), 713-33.
- Geffers, C. and Gastmeier, P. (2011): Nosocomial infections and multidrug-resistant organisms in Germany: epidemiological data from KISS (the Hospital Infection Surveillance System). *Dtsch Arztebl Int* **108** (6), 87-93.
- Geiger, J., Wessels, D., Lockhart, S. R. and Soll, D. R. (2004): Release of a potent polymorphonuclear leukocyte chemoattractant is regulated by white-opaque switching in Candida albicans. *Infect Immun* **72** (2), 667-77.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., *et al.* (1973): In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51** (5), 1417-23.
- Gillum, A. M., Tsay, E. Y. and Kirsch, D. R. (1984): Isolation of the Candida albicans gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of S. cerevisiae ura3 and E. coli pyrF mutations. *Mol Gen Genet* **198** (1), 179-82.
- Gross, O., Gewies, A., Finger, K., Schafer, M., Sparwasser, T., *et al.* (2006): Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* **442** (7103), 651-6.

- Guihard, P., Danger, Y., Brounais, B., David, E., Brion, R., *et al.* (2012): Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin M signaling. *Stem Cells* **30** (4), 762-72.
- Hampton, M. B., Kettle, A. J. and Winterbourn, C. C. (1998): Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* **92** (9), 3007-17.
- Horn, F., Heinekamp, T., Kniemeyer, O., Pollmacher, J., Valiante, V., *et al.* (2012): Systems biology of fungal infection. *Front Microbiol* **3** (108), 1-20.
- Jones, T., Federspiel, N. A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., *et al.* (2004): The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (19), 7329-34.
- Kaposzta, R., Tree, P., Marodi, L. and Gordon, S. (1998): Characteristics of invasive candidiasis in gamma interferon- and interleukin-4-deficient mice: role of macrophages in host defense against *Candida albicans*. *Infect Immun* **66** (4), 1708-17.
- Kim, J. and Sudbery, P. (2011): *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol* **49** (2), 171-7.
- Kohl, P. K. and Jodl, S. J. (2004): Infektionskrankheiten verstehen, erkennen, behandeln. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- Kolotila, M. P. and Diamond, R. D. (1990): Effects of neutrophils and in vitro oxidants on survival and phenotypic switching of *Candida albicans* WO-1. *Infect Immun* **58** (5), 1174-9.
- Kvaal, C., Lachke, S. A., Srikantha, T., Daniels, K., McCoy, J., *et al.* (1999): Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun* **67** (12), 6652-62.
- Lachke, S. A., Lockhart, S. R., Daniels, K. J. and Soll, D. R. (2003): Skin facilitates *Candida albicans* mating. *Infect Immun* **71** (9), 4970-6.
- Lee, W. L., Harrison, R. E. and Grinstein, S. (2003): Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect* **5** (14), 1299-306.
- Liang, S. C., Tan, X. Y., Luxenberg, D. P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., *et al.* (2006): Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* **203** (10), 2271-9.
- Lim, C. S., Rosli, R., Seow, H. F. and Chong, P. P. (2012): *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31** (1), 21-31.

- Lin, L., Ibrahim, A. S., Xu, X., Farber, J. M., Avanesian, V., *et al.* (2009): Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. *PLoS Pathog* **5** (12), e1000703.
- Linß, W. and Fanghänel, J. (1998): Histologie: Zytologie, Allgemeine Histologie, Mikroskopische Anatomie. Walter de Gruyter GmbH & Co., Berlin, New York.
- Lockhart, S. R., Pujol, C., Daniels, K. J., Miller, M. G., Johnson, A. D., *et al.* (2002): In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics* **162** (2), 737-45.
- Lohse, M. B. and Johnson, A. D. (2009): White-opaque switching in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **12** (6), 650-4.
- Male, D. (2005): Immunologie auf einen Blick. Elsevier GmbH, München.
- Marsh, P. and Martin, M. V. (2003): Orale Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Martin, R., Wachtler, B., Schaller, M., Wilson, D. and Hube, B. (2011): Host-pathogen interactions and virulence-associated genes during *Candida albicans* oral infections. *Int J Med Microbiol* **301** (5), 417-22.
- Molano, J., Bowers, B. and Cabib, E. (1980): Distribution of chitin in the yeast cell wall. An ultrastructural and chemical study. *J Cell Biol* **85** (2), 199-212.
- Moll, I. (2010): Dermatologie. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- Monroy-Perez, E., Sainz-Espunes, T., Paniagua-Contreras, G., Negrete-Abascal, E., Rodriguez-Moctezuma, J. R., *et al.* Frequency and expression of ALS and HWP1 genotypes in *Candida albicans* strains isolated from Mexican patients suffering from vaginal candidosis. *Mycoses* **55** (3), e151-7.
- Moreno-Ruiz, E., Galan-Diez, M., Zhu, W., Fernandez-Ruiz, E., d'Enfert, C., *et al.* (2009): *Candida albicans* internalization by host cells is mediated by a clathrin-dependent mechanism. *Cell Microbiol* **11** (8), 1179-89.
- Morschhauser, J. (2010): Regulation of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Med Microbiol Immunol* **199** (3), 165-72.
- Moyes, D. L., Runglall, M., Murciano, C., Shen, C., Nayar, D., *et al.* (2010): A biphasic innate immune MAPK response discriminates between the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* in epithelial cells. *Cell Host Microbe* **8** (3), 225-35.
- Muller, J. (1993): Characteristics of fungus carriers as a source of infection. *Zentralbl Hyg Umweltmed* **194** (1-2), 162-72.

- Murphy, K., Travers, P. and Walport, M. (2009): Janeway Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Naglik, J. R., Fidel, P. L., Jr. and Odds, F. C. (2008): Animal models of mucosal Candida infection. *FEMS Microbiol Lett* **283** (2), 129-39.
- Naglik, J. R., Moyes, D. L., Wachtler, B. and Hube, B. (2011): Candida albicans interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect* **13** (12-13), 963-76.
- Naglik, J. R., Newport, G., White, T. C., Fernandes-Naglik, L. L., Greenspan, J. S., *et al.* (1999): In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infect Immun* **67** (5), 2482-90.
- Nerlov, C. (2004): C/EBPalpha mutations in acute myeloid leukaemias. *Nat Rev Cancer* **4** (5), 394-400.
- Netea, M. G., Brown, G. D., Kullberg, B. J. and Gow, N. A. (2008): An integrated model of the recognition of Candida albicans by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* **6** (1), 67-78.
- Netea, M. G., Gow, N. A., Munro, C. A., Bates, S., Collins, C., *et al.* (2006): Immune sensing of Candida albicans requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* **116** (6), 1642-50.
- Netea, M. G., van Tits, L. J., Curfs, J. H., Amiot, F., Meis, J. F., *et al.* (1999): Increased susceptibility of TNF-alpha lymphotoxin-alpha double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of Candida albicans. *J Immunol* **163** (3), 1498-505.
- Niggli, V. (2003): Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *Int J Biochem Cell Biol* **35** (12), 1619-38.
- Nordenfelt, P. and Tapper, H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol* **90** (2), 271-84.
- Orfanos, C. E. and Garbe, C. (2002): Therapie der Hautkrankheiten. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Phan, Q. T., Myers, C. L., Fu, Y., Sheppard, D. C., Yeaman, M. R., *et al.* (2007): Als3 is a Candida albicans invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol* **5** (3), e64.
- Rink, L., Kruse, A. and Haase, H. (2012): Immunologie für Einsteiger. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

- Robert-Koch-Institut (2004): Pathogenetische Bedeutung der intestinalen Candidabesiedelung. *Bundesgesundheitsblatt* **6** (47), 587-600.
- Romani, L. (2004): Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* **4** (1), 1-23.
- Saegusa, S., Totsuka, M., Kaminogawa, S. and Hosoi, T. (2009): *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* stimulate cytokine secretion from human neutrophil-like HL-60 cells differentiated with retinoic acid or dimethylsulfoxide. *Biosci Biotechnol Biochem* **73** (12), 2600-8.
- Sandin, R. L., Rogers, A. L., Patterson, R. J. and Beneke, E. S. (1982): Evidence for mannose-mediated adherence of *Candida albicans* to human buccal cells in vitro. *Infect Immun* **35** (1), 79-85.
- Schaller, M., Boeld, U., Oberbauer, S., Hamm, G., Hube, B., *et al.* (2004): Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) induce protective Th1-type cytokine epithelial responses in an in vitro model of oral candidosis. *Microbiology* **150** (Pt 9), 2807-13.
- Schaller, M., Mailhammer, R., Grassl, G., Sander, C. A., Hube, B., *et al.* (2002): Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine expression correlated to the degree of virulence. *J Invest Dermatol* **118** (4), 652-7.
- Schaller, M. and Weindl, G. (2009): Models of oral and vaginal candidiasis based on in vitro reconstituted human epithelia for the study of host-pathogen interactions. *Methods Mol Biol* **470**, 327-45.
- Schaller, M., Zakikhany, K., Naglik, J. R., Weindl, G. and Hube, B. (2006): Models of oral and vaginal candidiasis based on in vitro reconstituted human epithelia. *Nat Protoc* **1** (6), 2767-73.
- Schütt, C. and Bröker, B. (2009): Grundwissen Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Scott, M. G., Davidson, D. J., Gold, M. R., Bowdish, D. and Hancock, R. E. (2002): The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J Immunol* **169** (7), 3883-91.
- Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M., *et al.* (1987): "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **169** (1), 189-97.
- Sohn, K., Schwenk, J., Urban, C., Lechner, J., Schweikert, M., *et al.* (2006): Getting in touch with *Candida albicans*: the cell wall of a fungal pathogen. *Curr Drug Targets* **7** (4), 505-12.

- Soll, D. R. (2009): Why does *Candida albicans* switch? *FEMS Yeast Res* **9** (7), 973-89.
- Soll, D. R., Morrow, B. and Srikantha, T. (1993): High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Trends Genet* **9** (2), 61-5.
- Sudbery, P., Gow, N. and Berman, J. (2004): The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **12** (7), 317-24.
- Szabo, E. K. and MacCallum, D. M. (2011): The contribution of mouse models to our understanding of systemic candidiasis. *FEMS Microbiol Lett* **320** (1), 1-8.
- Taylor, B. N., Hannemann, H., Sehna, M., Biesecker, A., Schweizer, A., *et al.* (2005): Induction of SAP7 correlates with virulence in an intravenous infection model of candidiasis but not in a vaginal infection model in mice. *Infect Immun* **73** (10), 7061-3.
- Tietz, H. J. and Mendling, W. (2001): Haut- und Vaginalmykosen. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin Wien.
- Tietz, H. J., Nenoff, P. and Ullmann, A. J. (2005): Organmykosen auf einen Blick: Diagnostik und Therapie lebensbedrohlicher Pilzinfektionen. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- Tonnetti, L., Spaccapelo, R., Cenci, E., Mencacci, A., Puccetti, P., *et al.* (1995): Interleukin-4 and -10 exacerbate candidiasis in mice. *Eur J Immunol* **25** (6), 1559-65.
- Tsai, P. W., Yang, C. Y., Chang, H. T. and Lan, C. Y. (2011): Human antimicrobial peptide LL-37 inhibits adhesion of *Candida albicans* by interacting with yeast cell-wall carbohydrates. *PLoS One* **6** (3), e17755.
- Urban, C. F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., *et al.* (2009): Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **5** (10), e1000639.
- Vecchiarelli, A., Monari, C., Palazzetti, B., Bistoni, F. and Casadevall, A. (2000): Dysregulation in IL-12 secretion by neutrophils from HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol* **121** (2), 311-9.
- Wachtler, B., Wilson, D., Haedicke, K., Dalle, F. and Hube, B. (2011): From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS One* **6** (2), e17046.
- Wachtler, B., Wilson, D. and Hube, B. (2011): *Candida albicans* adhesion to and invasion and damage of vaginal epithelial cells: stage-specific inhibition by clotrimazole and bifonazole. *Antimicrob Agents Chemother* **55** (9), 4436-9.

- Weindl, G., Naglik, J. R., Kaesler, S., Biedermann, T., Hube, B., *et al.* (2007): Human epithelial cells establish direct antifungal defense through TLR4-mediated signaling. *J Clin Invest* **117** (12), 3664-72.
- Weindl, G., Wagener, J. and Schaller, M. (2010): Epithelial cells and innate antifungal defense. *J Dent Res* **89** (7), 666-75.
- Whiteway, M. and Oberholzer, U. (2004): Candida morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* **7** (4), 350-7.
- Zhu, W. and Filler, S. G. (2009): Interactions of Candida albicans with Epithelial Cells. *Cell Microbiol.*

Anhang

Tab. 3.4: Induzierte Gene der Probe A431 + *Candida albicans* 7h

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_Caa_7h	pvalue_A431_Caa_7h
EDN2	endothelin 2	5.18554	0.005029
RASL12	RAS-like, family 12	2.79674	0.001100
FLJ44715	FLJ44715 gene product	2.76949	0.007864
INSIG2	insulin induced gene 2	2.59768	6.64E-05
		2.39542	0.002220
C8orf58	chromosome 8 open reading frame 58	2.09062	0.000188
PKD1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	2.01029	3.37E-05

Tab. 3.6: Gemeinsam reprimierte Gene der Proben A431 + *Candida albicans* 7h und A431 + *Candida albicans* + PMN 7h

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_Caa_7h	pvalue_A431_Caa_7h	FC_A431_Caa_PMN_7h	pvalue_A431_Caa_PMN_7h
		-5.1298	0.003382	-5.1804	0.000226
		-5.4512	2.32E-05	-6.4922	9.91E-08
		-7.9022	8.40E-05	-8.5633	1.97E-06

Tab. 3.8: 20 am stärksten reprimierte Gene der Probe A431 + *Candida albicans* + PMN 7h

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_Caa_PMN_7h	pvalue_A431_Caa_PMN_7h
		-5.8108	0.0025
HAS2	hyaluronan synthase 2	-4.6618	0.0012
		-4.1095	0.0041
		-3.5717	0.0019
		-3.5680	0.0072
		-3.2810	0.0047
RASL11B	RAS-like, family 11, member B	-3.2604	0.0007
		-3.2103	0.0001
OR1S2	olfactory receptor, family 1, subfamily S, member 2	-3.1516	0.0051
		-3.1378	0.0009
		-3.0062	0.0002
USH1C	Usher syndrome 1C (autosomal recessive, severe)	-2.9300	0.0052
		-2.9055	0.0054
MORC1	MORC family CW-type zinc finger 1	-2.8192	0.0078
WDR21A	WD repeat domain 21A	-2.8186	0.0073
FLJ16165	purple acid phosphatase long form	-2.7633	0.0008
SNAPC5	small nuclear RNA activating complex, polypeptide 5, 19kDa	-2.7020	0.0007
		-2.6867	0.0049
		-2.6180	0.0065
SLC8A3	solute carrier family 8 (sodium-calcium exchanger), member 3	-2.6086	0.0009

Tab. 3.9: Induzierte Gene der Probe A431 + *Candida albicans* 9h

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_Caa_9h	pvalue_A431_Caa_9h
		5.9425	0.0034
CCNG2	cyclin G2	2.9891	0.0068
CALB1	calbindin 1, 28kDa	2.3783	0.0001
LOC401152	HCV F-transactivated protein 1	2.2565	0.0004
		2.1303	0.0079
STYK1	serine/threonine/tyrosine kinase 1	2.0718	0.0031
CDC2L6	cell division cycle 2-like 6 (CDK8-like)	2.0507	0.0077

Tab. 3.10: Reprimierte Gene der Probe A431 + *Candida albicans* + PMN 9h

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_Caa_9h	pvalue_A431_Caa_9h
MAT2A	methionine adenosyltransferase II, alpha	-2.2150	1.14E-04

Tab. 3.12: Gemeinsam reprimierte Gene der Proben A431 + *Candida albicans* 9h und A431 + *Candida albicans* + PMN 9h

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_Caa_9h	pvalue_A431_Caa_9h	FC_A431_Caa_PMN_9h	pvalue_A431_Caa_PMN_9h
RASL11B	RAS-like, family 11, member B	-4.13046	0.00035	-4.95512	2.63E-06
		-2.95125	0.00937	-2.94998	0.00101
KIAA1666	KIAA1666 protein	-2.32861	0.00083	-2.83551	1.05E-06
ZNF30	zinc finger protein 30	-2.10533	0.00847	-2.73581	4.93E-06

Tab. 3.14: 20 am stärksten reprimierte Gene der Probe A431 + *Candida albicans* + PMN 9h

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_Caa_PMN_9h	pvalue_A431_Caa_PMN_9h
FLJ32569	hypothetical protein FLJ32569	-9.1911	0.0039
		-8.3256	0.0088
		-6.9945	0.0036
		-5.2709	0.0016
SBEM	small breast epithelial mucin	-5.0673	0.0044
C18orf57	chromosome 18 open reading frame 57	-4.8305	0.0005
ZNF566	zinc finger protein 566	-4.6331	0.0078
		-4.3536	0.0011
		-3.8991	0.0058
FLJ45187	hypothetical protein LOC387640	-3.8289	0.0052
ECEL1P2	endothelin converting enzyme-like 1, pseudogene 2	-3.8228	0.0095
DKK1	dickkopf homolog 1 (<i>Xenopus laevis</i>)	-3.6708	0.0001
		-3.6617	0.0084
		-3.6156	0.0024
C20orf177	chromosome 20 open reading frame 177	-3.2905	0.0000
CASQ1	calsequestrin 1 (fast-twitch, skeletal muscle)	-3.1547	0.0086
		-3.1386	0.0071
FIGN	fidgetin	-3.1287	0.0012
		-3.1066	0.0031
HOXA11	homeobox A11	-3.1035	0.0001

Tab. 3.16: Induzierte Gene der Probe A431 + *Candida albicans*

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_Caa	pvalue_A431_Caa
		4.2001	0.005043
		3.4359	0.006963
		3.2857	2.40E-05
		3.2499	0.008051
GUCA1C	guanylate cyclase activator 1C	3.2114	0.000113
		3.1032	0.008852
		2.7758	0.008816
ROR2	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2	2.7289	0.002027
		2.6876	0.004990
B3GNT4	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 4	2.6455	0.008933
DDX56	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 56	2.4172	2.68E-05
YEATS2	YEATS domain containing 2	2.3409	0.002433
B3GNT4	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 4	2.2646	0.000193
TRSPAP1	tRNA selenocysteine associated protein 1	2.2542	0.004636
FLJ38020	similar to absent in melanoma 1	2.2468	4.57E-06
		2.2159	7.29E-06
C17orf69	chromosome 17 open reading frame 69	2.1792	0.005083
TLE6	transducin-like enhancer of split 6 (E(sp1) homolog, Drosophila)	2.1768	0.002537
BLCAP	bladder cancer associated protein	2.1722	8.27E-05
VASN	vasorin	2.1504	0.008852
TAF9B	TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31kDa	2.1379	0.000545
		2.1107	0.005159
		2.0594	2.57E-05
AOX1	aldehyde oxidase 1	2.0588	0.005689
CLK3	CDC-like kinase 3	2.0439	1.88E-08
VPS37D	vacuolar protein sorting 37 homolog D (S. cerevisiae)	2.0109	0.001382

Tab. 3.17: Reprimierte Gene der Probe A431 + *Candida albicans*

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_Caa	pvalue_A431_Caa
LFNG	LFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	-2.1540	0.0033
		-2.3618	0.0006

Tab. 3.19: Gemeinsam reprimierte Gene der Proben A431 + *Candida albicans* und A431 + *Candida albicans* + PMN

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_Caa	pvalue_A431_Caa	FC_A431_Caa_PMN	pvalue_A431_Caa_PMN
PPRC1	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator-related 1	-2.44010	3.33E-03	-2.3665	0.0010
ZNF689	zinc finger protein 689	-2.06014	6.93E-03	-2.1139	0.0009
TTLL11	tubulin tyrosine ligase-like family, member 11	-2.12506	0.000626	-2.0798	0.0002

Tab. 3.21: 20 am stärksten reprimierte Gene der Probe A431 + *Candida albicans* + PMN

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_Caa_PMN	pvalue_A431_Caa_PMN
RYS1	ryanodine receptor 1 (skeletal)	-4.2155	0.0031
		-4.1689	0.0081
RRS1	RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog (S. cerevisiae)	-3.8263	0.0022
		-3.2357	0.0035
		-3.2015	0.0024
POLR3E	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E (80kD)	-3.1738	0.0048
		-3.1713	0.0084
		-2.9836	0.0001
SEN3	SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase 3	-2.9140	0.0052
KIAA0133	KIAA0133	-2.8044	0.0080
HIST1H1B	histone cluster 1, H1b	-2.6273	0.0027
PEO1	progressive external ophthalmoplegia 1	-2.6251	0.0009
ZNF35	zinc finger protein 35	-2.5393	0.0072
		-2.4628	0.0045
SPSB2	splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 2	-2.4546	0.0001
		-2.4432	0.0017
PRMT6	protein arginine methyltransferase 6	-2.3957	0.0099
SHMT1	serine hydroxymethyltransferase 1 (soluble)	-2.3853	0.0022
GAPDHS	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, spermatogenic	-2.3443	0.0053
ZNF785	zinc finger protein 785	-2.3436	0.0033

Tab. 3.23: 20 am stärksten reprimierte Gene der Proben A431 + *Candida albicans* + PMN und A431 + *Candida albicans* + HL-60

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_Caa_PMN	pvalue_A431_Caa_PMN	FC_A431_Caa_HL60	pvalue_A431_Caa_HL60
		-6.0083	0.001293	-5.9821	0.001536
C13orf25	chromosome 13 open reading frame 25	-4.3931	3.08E-06	-3.2033	0.000292
WDR21A	WD repeat domain 21A	-3.7921	0.000231	-4.0799	0.000105
RASL11B	RAS-like, family 11, member B	-3.5693	0.000200	-3.5908	0.000201
		-3.1678	0.005229	-3.1910	0.005402
C1orf163	chromosome 1 open reading frame 163	-3.1179	0.000291	-2.4191	0.008598
SRGAP1	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1	-3.0484	0.009695	-3.2099	0.006737
MGC16075	hypothetical protein MGC16075	-3.0392	0.003826	-2.9568	0.005637
		-2.7358	0.002174	-2.4588	0.008691
		-2.6913	0.000753	-2.3380	0.005888
ZNF485	zinc finger protein 485	-2.6893	0.003357	-2.7014	0.003586
FAM123B	family with sequence similarity 123B	-2.6384	0.000207	-2.5322	0.000454
		-2.6090	1.32E-05	-2.7051	6.82E-06
TMEM177	transmembrane protein 177	-2.5824	0.000425	-2.4252	0.001303
SAMD13	sterile alpha motif domain containing 13	-2.5754	3.63E-07	-2.3685	3.38E-06
KIAA1666	KIAA1666 protein	-2.5481	1.06E-05	-2.3019	9.86E-05
SNPH	syntaphilin	-2.5323	0.000957	-2.5677	0.000886
FLJ27365	FLJ27365 protein	-2.4657	0.001326	-2.6754	0.000430
		-2.4481	0.004090	-2.8074	0.000721
		-2.4394	0.005814	-2.4594	0.005888

Tab. 3.26: Induzierte Gene der Proben A431 + *Candida albicans* und A431 + *Candida albicans* + HL-60

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_Caa	pvalue_A431_Caa	FC_A431_Caa_HL60	pvalue_A431_Caa_HL60
NFIL3	nuclear factor, interleukin 3 regulated	2.0786	3.24E-03	2.2007	2.01E-04

Tab. 3.27: Reprimierte Gene der Proben A431 + *Candida albicans* und A431 + *Candida albicans* + HL-60

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_Caa	pvalue_A431_Caa	FC_A431_Caa_HL60	pvalue_A431_Caa_HL60
AMD1	adenosylmethionine decarboxylase 1	-2.4364	0.0055	-2.1142	0.0098
CDR2	cerebellar degeneration-related protein 2, 62kDa	-2.0727	0.0003	-2.0023	0.0001
HOXC13	homeobox C13	-2.0545	0.0016	-2.1105	0.0002
JAG1	jagged 1 (Alagille syndrome)	-2.0441	0.0016	-2.0131	0.0004

Tab. 3.29: Reprimierte Gene der Proben A431 + *Candida albicans* und A431 + *Candida albicans* + PMN + A431 und *Candida albicans* + HL-60

Gen Symbol	Gen Name	FC_A431_Caa	pvalue_A431_Caa	FC_A431_Caa_PMN	pvalue_A431_Caa_PMN	FC_A431_Caa_HL60	pvalue_A431_Caa_HL60
ZNF556	zinc finger protein 556	-2.7170	0.0034	-3.2192	5.10E-05	-3.4317	2.06E-05
C17orf51	chromosome 17 open reading frame 51	-2.6897	0.0017	-3.0025	5.08E-05	-2.6360	0.0004
ZNF30	zinc finger protein 30	-2.6474	7.28E-05	-3.3073	9.35E-08	-3.1421	3.23E-07
		-2.5990	0.0041	-3.0338	7.36E-05	-3.3324	1.79E-05
C14orf169	chromosome 14 open reading frame 169	-2.5470	0.0057	-2.6667	0.0006	-2.6970	0.0006
MAT2A	methionine adenosyltransferase II, alpha	-2.4734	4.76E-06	-2.8475	1.45E-08	-2.0124	0.0001
OVOL2	ovo-like 2 (Drosophila)	-2.4365	3.22E-06	-2.5545	8.68E-08	-2.9604	2.15E-09
LOC401431	hypothetical gene LOC401431	-2.2567	0.0071	-2.7112	6.96E-05	-3.2766	2.49E-06
		-2.2417	0.0014	-2.6203	9.55E-06	-2.0006	0.0023
LYPD1	LY6/PLAUR domain containing 1	-2.1631	0.0088	-2.8923	1.06E-05	-2.3207	0.0007
PIK3R3	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (p55, gamma)	-2.0936	0.0019	-2.4608	9.83E-06	-2.5842	3.64E-06
FOXL2	forkhead box L2	-2.0206	0.0051	-2.0958	0.0005	-2.2772	9.79E-05
		-2.0093	0.0089	-2.1399	0.0006	-2.5146	2.67E-05

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre nicht zustande gekommen, wenn ich nicht breite Unterstützung und Hilfe gehabt hätte.

Mein erster und herzlichster Dank gilt meiner Mentorin Prof. Dr. Ursula Bilitewski für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas, sowie die Unterstützung bei der Bearbeitung der Fragestellung. Danke für die vielen anregenden und kritischen, jedoch humorvollen und aufbauenden Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Michael Steinert danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats und die damit verbundenen Mühen.

Bei Herrn Prof. André Fleissner bedanke ich mich für die Bereitschaft, den Prüfungsvorsitz zu übernehmen.

Meinem Thesiskomitee, Prof. Dr. Petra Dersch und Prof. Dr. Peter Müller danke ich für die hilfreichen Diskussionen und positiven Worte während der Treffen.

Den „Dr. Jekyll und Mr. Hyde“ Projektpartnern danke ich für die zahlreichen spannenden Diskussionen. Bei Prof. Dr. Martin Schaller und Jeanette Wagener bedanke ich mich für die Einblicke in ihr Labor und die Einarbeitung in das „ThinCert“-Zellkulturmodell. Dr. Kai Sohn und Christian Grumaz danke ich für die Bereitstellung des *C. albicans* Stammes SC5314

Ein großes Dankeschön geht an die Array Facility des HZI, Dr. Robert Geffers, Petra Hagendorff und Sabrina Kaser für die Unterstützung bei den Microarrays und den immer freien Platz am LightCycler.

Herrn Dr. Lothar Gröbe danke ich für die Hilfe bei der FACS-Analyse.

Bei Herrn Dr. Stefan Krebs und Herta Spéri möchte ich mich für die zahlreichen Blutabnahmen bedanken.

Weiterhin danke ich allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biologische Systemanalyse für das nette Arbeitsklima und die Unterstützung. Es war immer was los im Labor und auch außerhalb der Arbeitszeiten hatten wir viel Spaß.

Ein ganz besonderer Dank gilt Carolin „Angie“ Kanzler für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor.

Daniela, dir als meiner Dr. Jekyll Leidensgenossin möchte ich besonders herzlich danken. An so manchen Tagen wurden wir wirklich von Dr. Jekyll zu Mr. Hyde, weil einfach mal gar nichts klappen wollte. Aber wir hatten trotzdem immer was zu lachen und viel Spaß zusammen. Vor allem in San Francisco - we biked the bridge, walked the park, climbed the peaks and challenged the pacific ocean - es war die schönste Dienstreise überhaupt.

Bei meinen freiwilligen Blutspendern möchte ich mich besonders bedanken. Allen voran Angie, Daniela, René und Stefanie. Ohne euer Blut wäre ich jetzt leer und diese Arbeit nie fertiggestellt worden.

Anna, bei dir möchte ich mich besonders für die Unterstützung bei der Array Auswertung bedanken. Immer wenn ich deine Hilfe brauchte oder einfach nur eine Frage hatte, standest du mir immer tatkräftig zur Seite.

Bei Dörthe und Bianca bedanke ich mich für die vielen fachlichen Gespräche und die unterstützenden Worte bei dem einen oder anderen Bierchen.

Ein ganz besonders großes Dankeschön geht an Frank Klambeck. Danke, dass du mich immer unterstützt und zu mir gehalten hast. Deine aufbauenden Worte und deine Motivation haben mir sehr geholfen.

Bei meinem Vater und meinen Brüdern möchte ich mich von Herzen bedanken. Ihr habt immer an mich geglaubt und mich unterstützt.

Mein letzter Dank geht an meine Mutter und meinen Großvater, die leider die Fertigstellung dieser Arbeit nicht mehr miterleben durften.

DVD mit digitalen Anhängen

Auf der beigefügten DVD befinden sich die Tabellen, Bilder und Filme der Kapitel:

- 3.1.1 LDH Sekretion während der Infektion mit verschiedenen *Candida albicans* Stämmen
- 3.1.2 Einfluss der MOI und der Infektionszeit auf die Epithelzellschädigung
- 3.3.1 Genexpressionsanalysen mittels Microarray
- 3.4.3 Kontinuierliche Aufnahmen der Infektion mit direktem Epithel- und Immunzellen Kontakt
- 3.4.6 Lebend Tot-Färbung
- 3.4.7 Färben von intrazellulärem IL-8
- 3.5 Genexpressionsanalysen mittels RT-PCR